

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Professor Dr. med. R. Hofmann

Stellenwert der Mismatch-Repair Gene in der Ausbildung der Chemorefraktarität bei testikulären Keimzelltumoren

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Elena Peitgen

aus Bonn

Marburg, 2007

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungen	4
1 Einleitung	6
1.1 Der Hoden	6
1.2 Tumore des Hodens	7
1.3 Stadieneinteilung	20
1.4 Therapie der Hodentumoren	22
1.5 Mismatch Repair Gene	26
1.6 Fragestellung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.2 Methoden	32
2.2.1 Einbettung	33
2.2.2 Herstellung der Paraffinschnitte	33
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung	34
2.2.4 Immunhistochemische Methoden	34
2.2.5 Durchführung	35
2.3 Dokumentation	36
2.4 Computerunterstützte Auswertung	37
3 Bilddokumentation	40
4 Ergebnisse	98
4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung	98
4.2 Immunhistochemische Ergebnisse	99
4.3 Ergebnisse der Computerauswertung	103
5 Diskussion	106
6 Zusammenfassung	112

Inhaltsverzeichnis

7	Literaturverzeichnis	114
8	Verzeichnis der akademischen Lehrer	120
9	Danksagung	121

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteine-aspartic-acid-proteases
µm ²	Quadrat Mikrometer
A.dest.	Aqua destillata
AFP	α-Fetoprotein
Beta-HCG	Human Chorionic Gonadotrophin
CIS	Carcinoma in situ
cm	Centimeter
CRC	Colorectal Carcinoma
DAB	Diaminobezidin
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DDP	Cisplatin (cis-Diamindichlorplatin(II))
ECA	Embryonalkarzinom
et al.	Et alteri
g	Gramm
KZT	Keimzelltumor
HD	High Dose
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
hMLH1	human mutL alpha homologue
hMSH2	human mutS alpha homologue
hMSH3	human mutS beta homologue
hMSH6	human mutS homolog 6
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
hPMS1	human postmeiotic segregation increased 1
hPMS2	human postmeiotic segregation increased 2
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
IHC	Immunhistochemie

Inhaltsverzeichnis

IU/L	International Units per Liter
JÜR	Jahres-Überlebensrate
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LK	Lymphknoten
MDR-1	Multidrug resistance protein
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
MMR	Mismatch-Repair-Genes
MSI	Microsatellite Instability
NaCl	Natriumchlorid
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Cisplatin und Etoposid
PEB	Cisplatin, Bleomycin, Etoposid
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid
PID	Personally Identifiable Data
PLAP	Plazentale Alkalische Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
RPLA	retroperitoneale Lymphadenektomie
TBS	Tris-Buffered Saline
TIN	Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UICC	Union internationale contre le cancer
VeIP	Vinblastin, Ifosfamid und Cisplatin
VIP	Etoposid, Ifosamid und Cisplatin
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Hoden

1.1.1 Anatomie und Histologie

Der Hoden des Erwachsenen hat eine durchschnittliche Grösse von 4x3x2,5 cm. Er wird von einer derben, weisslichen Bindegewebskapsel, der Tunica albuginea umgeben, die an der Hodenhinterwand in der Längsachse geringgradig in den Hodenkörper als Mediastinum testis hineinzieht. Ausgehend von diesem fibrösen Mediastinum teilen Septen den Hodeninnenraum in ca. 250 pyramidenförmige Lobuli testis ein. Jeder Lobulus beherbergt ca. 1 bis 4 stark aufgeknäulte Samenkanälchen, die Tubuli seminiferi contorti. Sie machen das Hodenparenchym aus. Diese Samenkanälchen werden von lockerem Bindegewebe umgeben, bestehend aus Bindegewebszellen, interstitiellen Zellen (Leydig-Zwischenzellen), sowie Nerven und Gefäßen. Die Tubuli seminiferi contorti gehen über kurze Tubuli recti in ein Netzwerk feiner Kanälchen, das Rete testis, über, welches seinerseits mit Ausführungsgängen, den Ductuli efferentes testis, mit dem Nebenhodengang verbunden ist. Normale Tubuli seminiferi besitzen eine Basalmembran und eine dünne fibröse Wand, auf der die Keimzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogenese zusammen mit den Sertoli-Zellen, den sogenannten Stützzellen, ruhen. Die Blut- und Lymphgefäße, sowie mesenchymales Stützgewebe, Makrophagen und Leydigzellen liegen im intertubulären Interstitium (Hautmann, R. und Huland, H, 1996).

1.1.2 Hodenentwicklung und Spermatogenese

Der Hoden geht wie das Ovar aus der Genitalleiste hervor. Kennzeichnend für die Hodenentwicklung ist der pränatale Descensus testis, der etwa zur Zeit der Geburt abgeschlossen ist. Dann sind die Hoden ins Skrotum verlagert.

Die Spermatogenese ist ein kontinuierlicher Vorgang, bei dem verschiedene Stadien durchlaufen werden. Während der Embryogenese und bis zur Pubertät werden die Urkeimzellen (Gameten) durch mitotische Teilung in Spermatogonien mit diploidem Chromosomensatz umgewandelt, aus denen sich lebenslang im Keimepithel der Tubuli seminiferi contorti primäre Spermatozyten entwickeln. Nach einer ersten Reifeteilung

Einleitung

werden diese zu sekundären Spermatozyten, aus denen sich durch eine zweite Reifeteilung zwei Spermatiden mit haploidem Chromosomensatz entwickeln. Anschließend erfolgt die Differenzierung zu reifen Spermien, die sogenannte Spermiogenese (Junqueira, L.C. und Carneiro J., 1996).

Wenn auch die Lymphgefäße streng genommen nicht zu dem Hoden gehören, so kann die Anatomie der drainierenden Lymphgefäße das Ausbreitungsmuster von Keimzelltumoren vorherbestimmen. Die Lymphgefäße des Hodens drainieren direkt in die retroperitonealen Lymphknoten.

1.2 Tumore des Hodens

Testikuläre Neoplasien sind die häufigsten soliden Malignome von Männern im Alter von 15 bis 35 Jahren. Insgesamt machen sie jedoch nur 1% aller soliden Tumoren bei Männern aus (Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., et al. 2003). Die Zahl an Neuerkrankungen beträgt ca. 7 auf 100.000 männliche Einwohner pro Jahr in Deutschland.

Die zwei Hauptgruppen sind die Keimzelltumore mit 95% und die Nicht-Keimzelltumore mit 5%. Die Keimzelltumore können aus einer dominierenden Histologie oder aus mehreren histologischen Komponenten, wie Seminom, embryonales-, Chorionkarzinom, Teratom (reif oder unreif) oder auch ein Yolk-Sac-Tumor bestehen. Für die Therapie ist die Einteilung der Hodentumore in zwei große Kategorien notwendig. Das reine Seminom (ohne nicht seminomatöse histologische Komponenten) und nicht-seminomatöse Keimzelltumore. Der Hodentumor gehört zu den soliden Malignomen mit der besten Prognose.

1.2.1 Testikuläre intraepitheliale Neoplasie

Die testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) ist die einheitliche Vorstufe der testikulären Keimzelltumore bei Erwachsenen, mit Ausnahme der spermatozytischen Seminome. Die Bezeichnungen sind uneinheitlich, man spricht auch von Carcinoma in

Einleitung

Situ (CIS) oder testikulärer Neoplasie. Da es sich aber nicht um eine epitheliale Läsion handelt, sollte der Begriff CIS mit Vorsicht benutzt werden.

Morphologisch besitzen TIN Zellen eine Ähnlichkeit zu Seminomen. TIN differenzieren sich entweder vom Seminom zum nicht-seminomatösen Keimzelltumor oder direkt in einen nicht-seminomatösen Keimzelltumor (Rajpert-De Meyts, E, Kvist, M et al., 1996).

TIN wird in 90% der Fälle in der Nähe zu Keimzelltumoren beobachtet, ebenso in Hodenkrebs Risikogruppen. Dazu zählen Männer mit Kryptorchismus (Dieckmann, KP, Skakkebaek, NE et al., 1999), früherem Hodenkrebs (von der Maase H, Rorth, M et al., 1986), sowie Patienten mit Androgenresistenz (Muller, J, Skakkebaek, NE et al., 1984).

TIN wird nicht in kindlichen Keimzelltumoren gefunden (Manivel, JC, Reinberg, Y et al., 1989).

In Skandinavien wird davon ausgegangen, dass alle unbehandelten Formen von TIN in Hodenkrebs übergehen. TIN Zellen gehen aus den Primordialzellen hervor, man geht davon aus, dass diese bereits bei Geburt vorhanden sind (Skakkebaek, NE, Berethelsen, JG et al., 1987).

Zwei Proteine, der c-kit Rezeptor (KIT) sowie Plazentale Alkalische Phosphatase (PLAP) werden von TIN Zellen in der 8. bis 12. Woche der Embryonalentwicklung überexprimiert (Jorgensen, N, Rajpert-De Meyts, E et al., 1995).

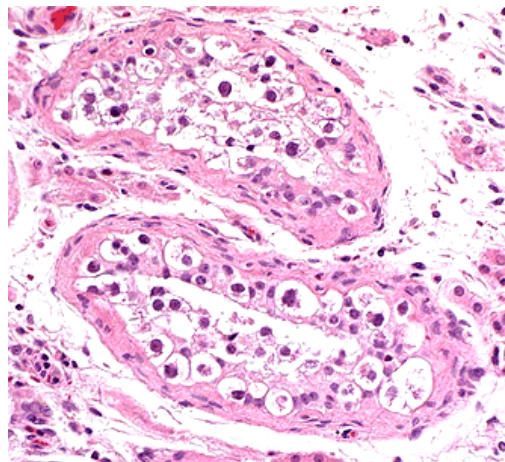


Abbildung 1.1

Mikroskopische Aufnahme einer TIN (testikuläre intraepitheliale Neoplasie). Dargestellt sind zwei Tubuli seminiferi in denen sich die seminom-artigen Zellen der TIN befinden. Die Zellen besitzen einen dunklen, runden Nukleus der von einem klaren Zytoplasma umgeben ist. Deshalb sagt man auch diese Zellen erinnern an Spiegeleier. Aus: Up to Date®, Michael Weinstein, MD, PhD.

Einleitung

Man geht davon aus, daß sich die TIN Zellen während der Pubertät aufgrund der Änderung des hormonellen Milieus zu teilen beginnen (Skakkebaek, NE, Berethelsen, JG et al., 1987).

Zunächst breitet sich TIN nicht invasiv entlang der Tubuli seminiferi aus. Sobald das Rete testis erreicht worden ist, breiten sich TIN Zellen auch in anderen Tubuli aus. Nach der Pubertät beginnt das invasive Wachstum. Jetzt können seminomatöse oder nicht-seminomatöse Hodentumore entstehen.

1.2.2 Risikofaktoren

Es gibt eine Reihe von bekannten Risikofaktoren für die testikulären Neoplasien. Beschrieben wurden unter anderem Kryptorchismus, familiäre Disposition und HIV Infektionen. Alle diese Risikofaktoren tragen zu der Ausbildung der TIN bei.

Zum Einfluss der familiären Disposition gibt es kontroverse Aussagen.

In der von Forman et al. publizierten großen Fall-Kontroll Studie mit 794 testikulären Tumorpatienten war der familiäre Risikofaktor der größte (Forman, D, Oliver, RT et al., 1992).

Han et al. zeigten 2000, dass das relative Risiko, Hodenkrebs zu entwickeln bei den Söhnen oder Brüdern eines an Hodenkrebs erkrankten Patienten um das 6 bis 10 fache erhöht ist (Han, S, Peschel, RE et al., 2000). Dieckmann et al. und Dong et al. veröffentlichten, dass 1% bis 2% der betroffenen Patienten ein Familienmitglied haben, welches erkrankt ist.

Als genetischer Faktor wird Isochromosom 12p diskutiert. Isochromosom 12p ist in den meisten Fällen von testikulären Keimzelltumoren, in 70 bis 80% der Tumore, die zytogenetische Auffälligkeiten aufweisen, präsent (Bosl, GJ, Ilson, DH et al., 1994). In einer neueren Arbeit (Rapley et al., 2000) werden Resultate präsentiert, die darauf hinweisen, dass es ein KZT Suszeptibilitäts-Gen auf dem Xq27 Chromosom geben könnte, womit das oft beobachtete familiäre Risiko für KZT belegt wird.

HIV Infektion: Eine erhöhte Inzidenz von Keimzelltumoren, vor allem von Seminomen, wurde bei HIV infizierten Männern nachgewiesen (Powles, T, Bower, M et al., 2003).

Es gibt eine Assoziation zwischen testikulärer Mikrolithiasis und Hodenkrebs wird kontrovers diskutiert: Manche Autoren (Derogee, M, et al., 2001, Powles, T, et al., 2003) finden eine Korrelation zwischen TM und KZT, sprechen von einem prämaligen Zustand und empfehlen follow-up Untersuchungen bzw. Biopsie. Andere (Dagash, H, et al., 2006) postulieren, dass TM alleine keine maligne Vorstufe darstellt, raten allerdings zu jährlichen Ultraschall follow-up Untersuchungen in Gegenwart von TM und weiteren prämaligen Faktoren.

Patienten mit einer Androgenresistenz, sowie gonadaler Dysgenese, haben ein erhöhtes Risiko (Muller, J, Ritzén, EM et al., 1999 und Gourlay, WA, Johnson, HW et al., 1994).

In Utero Exposition von Östrogenen wird in manchen Studien mit einem erhöhten Risiko, an einem Keimzelltumor zu erkranken, verbunden. In einem Fall wurde beschrieben, dass eine Östrogenexposition eine 4,9 fache Erhöhung des Risikos bedeutete (Weir, HK, Marrett, LD et al., 2000).

Strohsnitter et al. konnten den Einfluss der Östrogenexposition nicht beweisen, aber auch nicht ausschließen (Strohsnitter, WC, Noller, KL et al., 2001).

1.2.3 Einteilung der Hodentumore

Keimzelltumore des Hodens machen 95% der Hodentumore aus. Die Anzahl der reinen Seminome und aller anderen Entitäten, als nicht-seminomatöse Keimzelltumore bezeichnet, ist etwa gleich groß. Nicht-seminomatöse Keimzelltumore können entweder aus nur einem Anteil bestehen, oder häufiger aus zwei oder sogar mehr histologischen Typen.

Das durchschnittliche Alter an einem Seminom zu erkranken beträgt 40 Jahre, das ist etwa 10 Jahre später als die meisten nicht-seminomatösen Keimzelltumore auftreten. Da die Histologie eine große Bedeutung bei der Therapieplanung besitzt, ist eine genaue Bestimmung wichtig.

Die folgende Tabelle unterscheidet zwischen den nicht-seminomatösen, sowie den seminomatösen Tumoren. Diese Einteilung ist sinnvoll, da die Therapieplanung entscheidend von dieser Einteilung abhängt.

Tabelle 1.1 Histologische Einteilung der Keimzelltumore des Hodens in Seminome und Nicht-Seminome und deren Subtypen

Nicht-seminomatöse Keimzelltumore	Seminom
Embryonales Karzinom (Polyembryom)	klassisch (typisch)
Teratom -reif -unreif -reif oder unreif mit maligner Transformation	atypisch
Chorionkarzinom	spermatozystisch
Yolk-Sac-Tumor (Dottersack-Tumor)	
Mischtumor (enthält 2 oder mehrere Komponenten, alle 31 Kombinationen möglich)	
Teratokarzinom (veraltete Bezeichnung für Kombination aus Teratom und embryonalen Karzinom)	

Aus Bosl, GJ, Motzer, RJ. N Eng J Med 1997; 337:242

1.2.3.1 Seminome

Klassische Seminome

Klassische Seminome haben einen Anteil von ca. 50% an allen testikulären Keimzelltumoren, eine seminomatöse Komponente ist in ca. 20% aller gemischten Keimzelltumoren vorhanden (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al., 1984).

Serum Tumormarker sind in der Regel normal, lediglich in Seminomen, die synzytiotrophoblastische Riesenzellen enthalten, kann das beta-hCG erhöht sein. Auch in diesen Fällen bleibt das beta-hCG in der Regel unter 100 IU/L.

Eine Erhöhung des Serum beta-hCGs deutet auf ein größeres Tumolvolumen hin, aber nicht auf ein erhöhtes Malignitätspotential (Hori, K, Uematsu, K et al., 1997).

Seminome zeigen typische Kern- und Zytoplasma Strukturen.

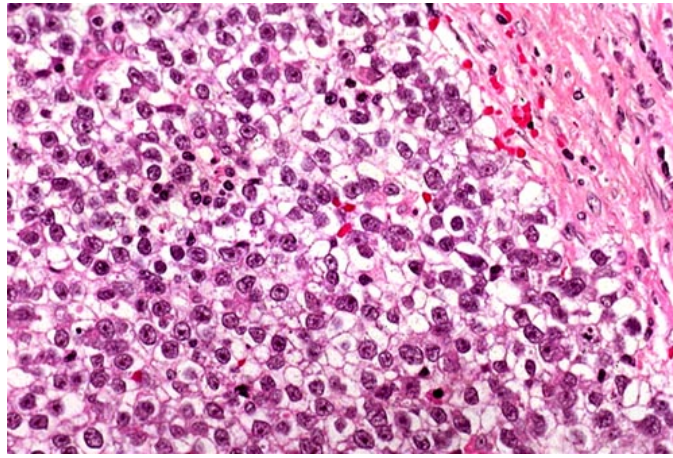


Abbildung 1.2

Haematoxylin-Eosin Färbung eines klassischen Seminoms. Die Zellen erinnern morphologisch an die Zellen der TIN. Die Zellen proliferieren als ein homogener Tumor.

In der Nähe der Tumorzellen werden häufig Lymphozyten gesehen. Die häufigste Ausschlussdiagnose ist das Lymphom. Gelegentlich kann ein Seminom auf HE gefärbten Schnitten auch Ähnlichkeiten zu einem anderen

Keimzelltumor besitzen, vornehmlich zu einem sog. Yolk-Sac Tumor.

Die immunhistochemische Anfärbung der plazentalen alkalischen Phosphatase (PLAP) ist positiv (Cummings, OW, Ulbright, TM et al., 1994).

Atypisches und spermatozystisches Seminom.

Zusätzlich zu dem klassischen Seminom gibt es zwei histologische Varianten des Seminoms.

Atypische Seminome zeichnen sich durch ausgeprägte Kernatypien, sowie erhöhte Mitosenrate aus. Das Überleben mit einem atypischen Seminom ist vergleichbar mit dem bei dem klassischen Seminom eines vergleichbaren Stadiums, wenn eine entsprechende Behandlung erfolgt (Reddy, EK, Burke, M et al., 1990).

Auch wenn das spermatozystische Seminom als eine Variante des Seminoms gilt, so unterscheidet es sich doch von diesem in eigentlich allen immunhistochemischen sowie

Einleitung

molekularbiologischen Kriterien. Es macht 3 bis 4% aller reinen Seminome aus, (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al., 1984) kommt nur bei Erwachsenen vor, in der Regel nach dem 60. Lebensjahr und metastasiert nur sehr selten (Talerman, A., 1980).

In seltenen Fällen kann es zu einer sarkomatösen Transformation kommen (Burke, AP, Mostofi, FK, 1993).

Die immunhistochemische Anfärbung der plazentalen alkalischen Phosphatase (PLAP) ist negativ (Cummings, OW, Ulbright, TM et al., 1994).

Im Unterschied zu anderen Seminomen ist das spermatozystische Seminom nicht Teil von Mischtumoren, es gibt auch keine Assoziation zur TIN.

1.2.3.2 Nicht-seminomatöse Keimzelltumore

Embryonales Karzinom

Das reine embryonale Karzinom macht ca. 2% aller testikulären Keimzelltumoren aus (Mostofi, FK, Sesterhenn, IA et al., 1988). Es ist aber zu 85% an den Mischtumoren beteiligt (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al., 1984). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 30 Jahren, wie bei anderen nichtseminomatösen Keimzelltumoren.

Das reine embryonale Karzinom produziert kein alpha-foetoprotein (AFP).

Ein deutlicherer Anstieg, z.B. mehr als 60ng/mL deutet auf einen mitvorhandenen Yolk-Sac Tumor hin (Talerman, A, Haije, WG et al., 1980).

Wie auch beim Seminom kann das Vorhandensein von synzytiotrophoblastischen Riesenzellen innerhalb eines embryonalen Karzinoms eine mäßige Erhöhung des Serum beta-hCGs bewirken.

Mikroskopisch zeigt das embryonale Karzinom eine epitheliale Differenzierung mit zusammenhängenden Zellgruppen, die cytokeratin-positiv sind. Die Zellen enthalten oft Kernatypien, hier gelingt eine Unterscheidung von den Yolk-Sac Tumoren, die eher eine blande Kernmorphologie besitzen. Es zeigen sich glanduläre, papilläre, sowie solide Strukturen. Diese Unterschiede haben jedoch keine klinische Relevanz.

Teratom

Das Teratom bezeichnet eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren. Die Tumoren zeigen somatisch differenziertes Gewebe, pluripotente Zellen, wie man sie in Embryonen aber auch bei Erwachsenen findet (Brosman, SA., 1979) "Pluripotente" Zellen sind solche, die noch nicht auf einen bestimmten Gewebetyp festgelegt sind, sondern die Anlage besitzen, sich zu mehreren verschiedenen Zelltypen weiterzuentwickeln. Teratome des Hodens findet man in präpubertären, aber auch in erwachsenen Männern. Die Prognose ist eine erheblich unterschiedliche. Im Kindesalter treten sie am häufigsten um das 4. Lebensjahr auf. Es handelt sich in der Regel um reine Teratome und sie verhalten sich eher gutartig (Brosman, SA., 1979). Bei Erwachsenen sind sie meist Teil eines Mischtumors und haben die Fähigkeit zu metastasieren. Erhöhte Serumkonzentrationen von AFP oder beta-hCG können nicht auf Teratomanteile zurückgeführt werden (Talerman, A, Haije, WG et al., 1980). Sie geben eher einen Hinweis auf die Koexistenz von anderen Keimzelltumor Elementen. Die unterschiedliche Diagnose, reifes oder unreifes Teratom, besitzt keine große klinische Relevanz. Trotzdem nimmt man häufig die Einteilung in folgende drei Gruppen vor:

1. Das reife Teratom besteht aus differenzierten Zellen oder organähnlichen Strukturen, eingebettet in einem fibrösen oder myxoiden Stroma (Cotran, RS, Kumar, V et al., 1999). Die Gewebetypen, die am häufigsten gesehen werden, sind denen aus dem Respirationstrakt, Darm, Pankreas, Schilddrüse, Knorpel, oder Hautanhangsgebilden ähnlich.
2. Das unreife Teratom besteht aus undifferenzierten Elementen, die denen embryonaler Entwicklungsstufen ähneln. Das Vorhandensein primitiver neuroepithelialer Elemente rechtfertigt den Ausdruck unreif.
3. Eine sehr kleine Gruppe von Teratomen besitzt im Gegensatz zu dem reifen und unreifen Teratom maligne Gewebeanteile. Dazu gehören das squamöse Zellkarzinom, das Adenokarzinom oder Sarkome, wie das Rhabdomyosarkom (Motzer, RJ, Amsterdam, A

et al., 1998). Patienten mit diesen Gewebeteilen zeigen häufig Metastasen. Diese Teratome sprechen nicht gut auf die herkömmliche Chemotherapie mit Cisplatin an. Stattdessen muss die Chemotherapie den vorhandenen Anteilen angepasst werden (Donadio, AC, Motzer, RJ et al., 2003). Wenn maligne Anteile einen bedeutenden Anteil des Teratoms ausmachen, bedeutet dies eine deutlich schlechtere Prognose, vor allem wenn Metastasen vorhanden sind (Ahmed, T, Bosl, GJ et al., 1985).

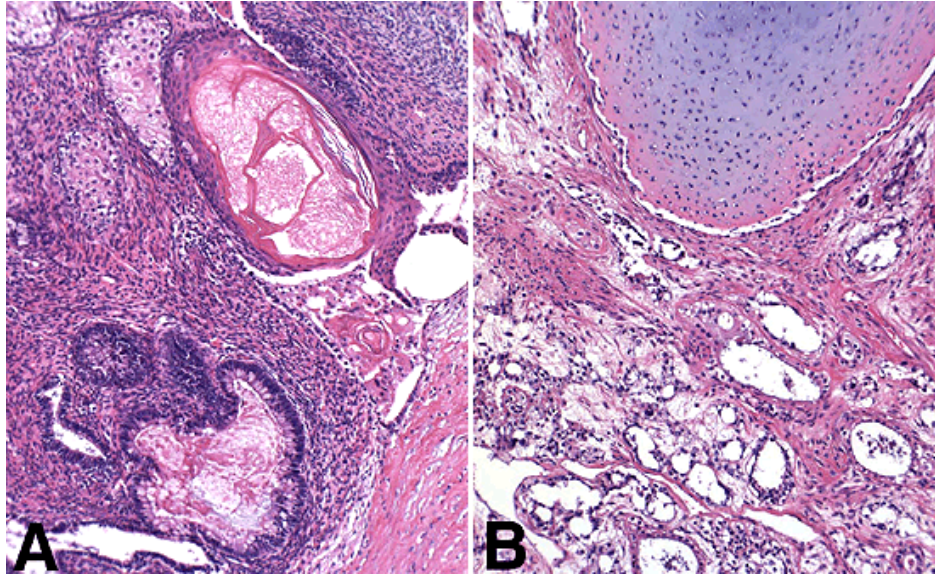


Abbildung 1.3

Mikroskopische Aufnahme eines gemischten Keimzelltumors bestehend aus teratomatösen- sowie aus Yolk-Sac-Tumor Anteilen.

(A): Squamöses Epithel und enterisches Epithel vorhanden.

(B): Knorpel (oben) und Yolk-Sac Tumor (unten). Aus: Up to Date® von Michael Weinstein, MD, PhD.

Chorionkarzinom

Der aggressivste Keimzelltumor ist das Chorionkarzinom. Die Ausbreitung erfolgt früh über eine hämatogene Metastasierung. Das Chorionkarzinom ist zu 10% an den Mischtumoren beteiligt (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al., 1984). In seiner reinen Form ist es selten (Mostofi, FK, Price, EB Jr., 1973). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt unter dem der übrigen Keimzelltumoren, aber selten bei

Einleitung

präpubertären Männern. Das Serum beta-hCG ist oft über 1000IU/L, kann sogar noch höher liegen. Chorionkarzinome produzieren kein AFP.

Makroskopisch sieht man haemorrhagische, sowie nekrotische Bezirke.

Das Hauptcharakteristikum ist das gemeinsame Auftreten von

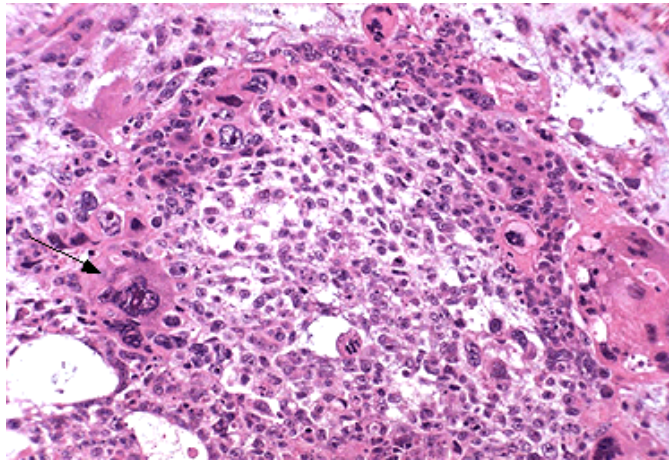


Abbildung 1.4

Mikroskopische Aufnahme eines testikulären Chorionkarzinoms. Die zentralen, kleineren zytotrophoblastischen Zellen mit klarem Zytoplasma werden von den wesentlich größeren synzytiotrophoblastischen Riesenzellen (schwarzer Pfeil) umgeben. Sie besitzen große pleomorphe Nuklei und eosinophiles Zytoplasma. Aus: Up to Date® von Michael Weinstein, MD, PhD.

synzytiotrophoblastischen sowie zytotrophoblastischen Zellen, dadurch unterscheiden sich die Chorionkarzinome von den anderen Keimzelltumoren, die synzytiotrophoblastische Elemente besitzen. Ähnlich zu ihrer Funktion im Embryo zeigen sie eine ausgeprägte vaskuläre Invasion. Das scheint die Hauptursache für die frühe hämatogene Ausbreitung zu sein. Die beta-hCG Anfärbung hat keine starke Aussage bei Chorionkarzinomen. Eine genaue Inspektion einer großen Anzahl verschiedener Anteile des Tumors ist unerlässlich.

Yolk-Sac Tumore

Ein reiner Yolk-Sac Tumor ist der häufigste Keimzelltumor im Kindesalter (Brown, NJ., 1976). Ein Vorkommen im Erwachsenenalter ist selten. Der Yolk-Sac Tumor ist relativ häufig, in 40% der Fälle eine Komponente eines Mischtumors (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al. , 1984).

Fast alle Yolk-Sac Tumoren haben ein erhöhtes AFP, in der Regel über 100ng/mL, und die Höhe des AFP korreliert mit der Krankheitsausdehnung (Talerman, A, Haije, WG et al., 1980). Konzentrationen über 1000ng/mL deuten auf einen fortgeschrittenen Tumor hin. Yolk-Sac Tumore produzieren kein beta-hCG. Mikroskopisch zeigen die Yolk-Sac Tumore in der Gruppe der Keimzelltumoren die größte Variabilität. Man unterscheidet retikuläre, papilläre, glanduläre, solide und hepatische Strukturen. Schiller-Duval Körper sind typisch, kommen aber nur selten vor. Dabei handelt es sich um Strukturen, die an fetale Glomeruli erinnern, bestehend aus einem zentralen Blutgefäß umgeben von embryonalen Zellen.

Die Hauptdifferentialdiagnose ist das embryonale Karzinom.

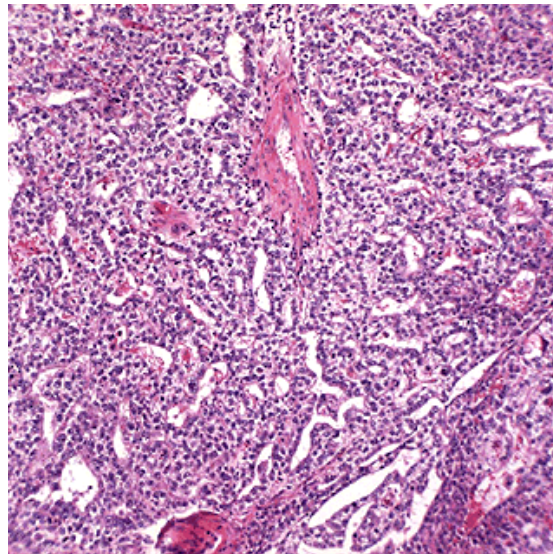


Abbildung 1.5

Mikroskopische Aufnahme eines Yolk-Sac-Tumors. Hier wird eine von vielen histologischen Varianten demonstriert. Die Zellen zeigen eine geringere Anzahl von Atypien als bei dem embryonalen Karzinom. Aus: Up to Date® von Michael Weinstein, MD, PhD.

Yolk-Sac Tumore haben weniger Kernatypien als das embryonale Karzinom.

Mischtumore

Mischtumore machen etwa ein Drittel aller Keimzelltumoren aus. Sie enthalten zwei oder mehr Keimzelltumorkomponenten (Krag Jacobsen, G, Barlebo, H et al., 1984). Ein teratomatöser Anteil wird in ca. einem Drittel aller gemischten Keimzelltumoren gefunden. Alle 31 Kombinationen von Seminom, Teratom, embryonalem Karzinom, Yolk-Sac Tumor und Chorionkarzinom sind möglich. Der Begriff Teratokarzinom bezeichnet das gemeinsame Auftreten von Teratom und embryonalem Karzinom. Dieser Ausdruck wird jedoch aufgrund seiner Ungenauigkeit seltener benutzt. Stattdessen spricht man von einem malignen Keimzelltumor und beschreibt die einzelnen enthaltenen Komponenten. Die Epidemiologie und Klinik der gemischten Keimzelltumoren sowie der nicht-seminomatösen Keimzelltumoren des Erwachsenen sind einander ähnlich. Sie kommen selten bei präpubertären Männern vor, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 30 Jahren.

Erhöhtes AFP sowie beta-hCG sprechen für die vorhandenen Tumorkomponenten. Die Metastasen der Mischtumoren können eine andere Histologie als der Primärtumor aufweisen. Zum Beispiel können Metastasen eines reinen Seminoms nicht-seminomatöse Anteile enthalten. Dafür gibt es mindestens zwei Erklärungen. Einmal kann der Primärtumor aufgrund der Selektion eines Klonen, der die Fähigkeit besitzt zu metastasieren, den Phänotypen geändert haben. Eine andere Erklärung wäre, dass der Tumoranteil, der zur Metastasierung befähigt war, schon im Primärtumor vorhanden war, bei der histologischen Untersuchung aber nicht gefunden wurde. Wie auch bei den primären Keimzelltumoren kann ein Anstieg der Tumormarker Klarheit über die Komponenten, die in den Metastasen enthalten sind, Aufschluss geben.

Manche Keimzelltumoren werden außerhalb des Hodens gefunden. Man spricht von extragonadalen Keimzelltumoren. Sie können im Retroperitoneum, Mediastinum oder im

Einleitung

ZNS auftreten, ohne einen testikulären Primärbefund. In manchen Fällen handelt es sich aber auch um Metastasen eines okkulten testikulären Primärtumors.

Nicht-Keimzelltumoren

Keimstrang-Tumoren ähneln in ihrer Struktur Leydig-, Sertoli- oder anderen Keimstrang/Stromazellen. Diese Tumoren sind bedeutend seltener als Keimzelltumoren. Sie machen weniger als 5% aller testikulärer Neoplasien bei Erwachsenen aus.

Sie sind etwas häufiger bei präpubertären Männern (Ulbright TM, Amin MB et al., 1999). Im Gegensatz zu den Keimzelltumoren ist es hier oft schwierig, die Malignität der Tumoren vorherzusagen. Jedoch steigt die Wahrscheinlichkeit für ein malignes Verhalten an, wenn der Tumor Anzeichen von lokaler oder Gefäßinvasivität besitzt. Manche dieser Tumoren produzieren Steroide, werden in diesem Zusammenhang bei endokrinen Krankheitsbildern gesehen, vor allem bei präpubertären Männern. Am häufigsten sind die Leydigzell-Tumoren. Leydigzellen sind hauptverantwortlich für die Testosteronproduktion, sie sind aber auch in der Lage, Östrogene zu produzieren. Leydigzell-Tumoren haben eine erhöhte Aromatase Expression, entsprechend sind die Östrogene vermehrt (Bercovici, J-P, Nahoul, K et al., 1985 und Bulun, SE, Rosenthal, IM et al., 1994). Das häufigste Merkmal ist die Gynäkomastie.

1.3 Stadieneinteilung

Neben der Histologie ist auch die Stadieneinteilung von großer Bedeutung. Von ihr sind sowohl die Prognose als auch die Therapieplanung abhängig.

Kriterien sind Größe, Ausdehnung, Infiltration des Tumors. Ferner entscheidend sind Metastasierung und auch das Vorhandensein von Tumormarkern.

Tabelle 1.2

TNM-Klassifikation von Keimzelltumoren des Hodens UICC, 1997 5. Fassung; Mc Caffrey et al. 1998

Primärtumor

pTx	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie
pT1	Tumor auf Hoden begrenzt
pT2	Tumor infiltriert jenseits der Tunica albuginea oder in den Nebenhoden.
pT3	Tumor infiltriert Samenstrang
pT4	Tumor infiltriert Skrotum

Regionäre Lymphknoten

Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	1 bis 5 Lymphknotenmetastasen, keine über 2cm im Durchmesser
N2	Lymphknotenmetastase mit 2 bis 5cm Durchmesser oder multiple Lymphknotenmetastasen, aber mit weniger als 5cm Durchmesser.
N3	Lymphknotenmetastase(n) mit mehr als 5cm Durchmesser.

Fernmetastasen

Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastase
M1a	nichtregionale Lymphknoten- oder Lungenmetastase
M1b	viszerale Metastasen außerhalb der Lunge

Einleitung

Ferner gibt es die Einteilung nach Prognosekriterien, diese sind wichtig für das Finden der optimalen Therapie. Die gängigsten Einteilungen sind die nach der IGCCCG (International Germ Cell Cancer Collaborative Group), sowie die Stadieneinteilung nach Lugano.

Tabelle 1.3

Internationale Prognose-Klassifikation der fortgeschrittenen Hodentumore

Nach Konsensus-Konferenz der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) 1995.

Prognosekategorien Seminom		Nicht-Seminom
Günstig	90% der Patienten Jedes T, N, M1a Normales AFP, jedes HCG und LDH	56% der Patienten Jedes T, N, M1a, S1
Intermediär	10% der Patienten Jedes T,N,M Normales AFP, jedes HCG und LDH	28% der Patienten Jedes T, N, M1a, S2
Ungünstig	--	16% der Patienten Jedes T,N,M, S3

Tabelle 1.4

Stadieneinteilung nach Lugano Stadiengruppierung

IA	pT1 N0 M0 S0		
IB	pT2-4 S0		
IS	pT1-4 S1-3		
IIA	pT1-4 N1 M0 S0/1		
IIB	pT1-4 N2 M0 S0/1		
IIC	pT1-4 N3 M0 S0/1		
IIIA	pT1-4 N0-3 M1a S0	oder	pT1-4 N0-3 M1a S1
IIIB	pT1-4 N1-3 M0 S2	oder	pT1-4 N1-3 M1a S2
IIIC	pT1-4 N1-3 M0 S3	oder	pT1-4 N1-3 M1a S3 oder pT1-4 N1-3 M1b S0-3

Tabelle 1.5
Einteilung nach Tumormarker

S-Stadium (Tumormarker)

	LDH		HCG (IU/L)*		AFP (ng/ml)
S0	N	und	<5	und	<10
S1	<1,5xN	und	<5000	und	<1000
S2	1,5-10xN	oder	5000-50 000	oder	1000-10 000
S3	>10xN	oder	>50 000	oder	>10 000

* HCG: 1ng/ml = 5 IU/L

1.4 Therapie der Hodentumore

Die Therapie des Hodenkrebses hat seit Mitte der 70er Jahre sehr große Fortschritte gemacht. Der Hodenkrebs gehört heute zu den am besten heilbaren Krebsarten überhaupt. In den USA rechnet man pro Jahr noch mit ca. 400 an Hodenkrebs verstorbenen Männern. Die heutige 5 Jahre Überlebensrate (5 JÜR) beträgt über 90% für die Keimzelltumoren insgesamt, über 95% für die Seminome (Jemal, A, Murray, T et al., 2003 und Bosl, GJ, Motzer, RJ, 1997).

Ein Grund dafür ist das besonders gute Ansprechen der testikulären Keimzelltumoren auf systemische Chemotherapie. Die Therapie wird eingeteilt für die zwei Gruppen, Seminome und Nicht-Seminome.

Der größte Anteil von Männern mit einem testikulären Keimzelltumor präsentiert sich mit einer schmerzlosen Schwellung im Hoden. Es folgen die genaue Diagnostik und das Staging. Nachdem Histologie und mögliche Ausweitung der Erkrankung bekannt sind, ist eine optimale Therapiefindung möglich. Dazu gehören Hodensonographie, Messen der Serum Tumormarker (AFP, beta-hCG und Laktat Dehydrogenase), radikale inguinale Orchiektomie und in manchen Fällen auch die retroperitoneale Lymphknoten Dissektion. Die initiale Therapie richtet sich nach der Histologie und nach der Ausbreitung der Krankheit, berücksichtigend die Guidelines der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG). Diese Klassifikation ist insbesondere bei dem vorangeschrittenen Keimzelltumor hilfreich, da sie eine Einteilung in Prognosegruppen erlaubt und somit die Einleitung einer passenden Chemotherapie vereinfacht (siehe

Tabelle 1.3). Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren unterscheiden sich von Seminomen in Bezug auf ihr klinisches wie auch auf ihr biologisches Verhalten. Diese Unterschiede sind für die Therapie entscheidend.

Im folgenden soll nun genauer auf die Therapie der zwei Tumorgruppen, des Seminoms und des nicht-seminomatösen Keimzelltumors eingegangen werden.

1.4.1 Therapie des Seminoms

Etwa 80% der Männer mit Seminom weisen das Stadium 1 auf (Erkrankung auf Hoden beschränkt).

15% haben das Stadium 2 (beschränkt auf retroperitoneale Lymphknoten). Weniger als 5% der Patienten haben über die retroperitonealen Lymphknoten hinaus gestreut.

Nach erfolgter Ablatio testis ergeben sich folgende Therapieschemata:

Stadium I:

Adjuvante Strahlentherapie der infradiaphragmalen, paraaortalen Lymphknoten Stationen. Wenn man statt Bestrahlung die Beobachtung („wait and see“) wählt, ergibt sich ein Rezidivrisiko von 20%.

Stadium IIA:

Wie Stadium I, zusätzliche Bestrahlung der ipsilateralen Lymphknotenstationen.

Stadium IIB:

Wie IIA, aber höhere Gesamtbestrahlung.

Stadium IIC bis III:

Hier erfolgt eine Chemotherapie.

Gute Prognose :

(siehe Tabelle 1.3) 3 Zyklen PEB (Cisplatin, Bleomycin, Etoposid).

Intermediäre Prognose:

Zunächst 4 Zyklen PEB. Wenn nach der Chemotherapie ein Resttumor von kleiner 3cm besteht, kann man abwarten, aber weiter beobachten. Sollte ein Resttumor bestehen, der

größer als 3cm ist, erfolgt eine Resektion sowie eine Fortführung der Chemotherapie mit 2 Zyklen PEI (Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid).

1.4.2 Therapie der nicht-seminomatösen Keimzelltumoren nach Ablatio testis

Stadium I: Ejakulationsprotektive retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLA). Bei positivem Befund sollte eine Chemotherapie mit 2 Zyklen PEB erfolgen.

Im Stadium I gibt es auch die Möglichkeit des „wait and see“, wenn weder eine lymphatische, noch eine venöse Invasion vorliegen (L0/V0). Dazu muß der Patient für 5 Jahre streng kontrolliert werden.

Stadium IIA/B: Hier gibt es verschiedene Therapiemöglichkeiten

- RPLA und adjuvante Chemotherapie, 2 Zyklen PEB
- RPLA ohne adjuvante Chemotherapie, im Falle eines Rezidivs 3 Zyklen PEB.
- Primäre Chemotherapie mit 3 Zyklen PEB und eventuell Residualtumorresektion. Dies trifft auf alle Patienten mit negativen Tumormarkern und bildgebenden Residuen, die größer als 1cm sind, zu. Bei grenzwertigen oder unklaren Befunden sollte eine engmaschige Kontrolle stattfinden.

Stadium IIC und III: Vorgehen nach Prognose (siehe Tabelle 1.3).

Günstige Prognose:	3 Zyklen PEB oder 4-5 Zyklen PE (Cisplatin und Etoposid)
Intermediäre Prognose:	3 bis 4 Zyklen PEB
Ungünstige Prognose:	4 Zyklen PEI oder 4 Zyklen PEB. Hochdosierte Chemotherapie noch im Versuch.

In allen Stadien Residualtumorresektion, bei gleichzeitigem Markeranstieg erneute Chemotherapie (Salvage-Regime oder HD-Therapie).

Die Therapie des Chorionkarzinoms steht außen vor, da es sich hier um einen besonders aggressiven Tumor handelt. Es finden sich häufig Bulky Disease, sowie eine frühe hämatogene Streuung. Deshalb erfolgt eine initial aggressive Chemotherapie und eventuell postprimäre RPLA.

Einleitung

Bei der Salvage-Therapie haben sich die beiden folgenden Therapien als am wirksamsten herausgestellt. Es sind **VIP** (Etoposid, Ifosamid und Cisplatin) sowie **VeIP** (Vinblastin, Ifosamid und Cisplatin). Männer, die in der vorherigen Chemotherapie Etoposid erhalten haben, werden in der Regel mit VeIP behandelt. Solche, die vorher kein Etoposid erhalten haben, werden mit VIP behandelt. Beide Behandlungsschemata können in 25 bis 30% der Fälle zu Remissionen führen. Aber nur 30% erreichen eine langandauernde Remission.

Hochdosierte Chemotherapie

Die meisten Rezidive treten innerhalb der ersten 2 Jahre nach abgeschlossener Chemotherapie auf. Mehr als die Hälfte der Spätrezidive, als solche werden jene Rezidive definiert, die später als nach zwei Jahren auftreten, treten nach 5 Jahren auf. 30 bis 50% dieser Spätrezidive haben normale Serumentumormarker. Hier sollte eine radikale chirurgische Entfernung erfolgen, um ein Überleben des Patienten zu sichern.

1.5 Mismatch Repair Gene

Der Entstehung von Neoplasien liegt nicht nur ein einziges Ereignis zu Grunde. Es handelt sich vielmehr um eine zelluläre Entwicklung von normaler Zellarchitektur zur Dysplasie und letztendlich zu invasivem Krebs mit Metastasenbildung. Man erklärt sich diesen Prozess durch eine fortschreitende Ansammlung von genetischen Alterationen. Genetische Modifikationen in zwei Haupt Gen-Klassen, den Proto-onkogenen und Tumor-Suppressorgenen sind bekannt für ihren Beitrag zur Tumorgenese. Protoonkogene sind Vorstufen von Onkogenen und werden durch schädliche Einflüsse wie z.B. radioaktive Strahlung, chemische Substanzen oder auch Viren in die krebserzeugende Form umgewandelt.

Gegenspieler zu den Onkogenen sind die Produkte der Tumorsuppressorgene, die das Entstehen eines Malignoms verhindern können. Ihre Funktion ist in Tumoren oft verändert.

Eine dritte Gen-Klasse, die bei der Reparatur von Schäden an der DNA eine Rolle spielt, die Mismatch Repair Gene, sollen in der Entwicklung und Prädisposition zur Krebsentstehung mitwirken (Ionov Y, Peinado MA et al., 1993). DNA Basen, die ein Mismatch (nicht übereinstimmende Basen-Paarung) aufweisen, kommen während der DNA Replikation vor. Sie werden durch ein DNA Reparatur System behoben, welches mindestens 6 Gene beinhaltet: human mutL homologue 1 (hMLH1), human mutS homologue 2 (hMSH2), human mutS homologue 3 (hMSH3), human mutS homologue 6 (hMSH6), und human post-meiotic segregation (hPMS1 und hPMS2) (Nicolaidis NC, Papadopoulos N et al., 1994). Zusätzlich ist mit MLH3 ein neuartiges DNA Mismatch-Repair Gen geklont worden (Lipkin SM, Wang V et al., 2000). Eine Inaktivierung der Mismatch-Repair Gene führt zu genetischen Alterationen, charakterisiert von kleinen Deletionen oder Expansionen innerhalb kleiner repetitiver Sequenzen in Tumor DNA, verglichen mit übereinstimmender normaler DNA. Dies ist bekannt als Mikrosatelliten Instabilität (MSI). Mikrosatelliten sind kleine DNA Sequenzen, diese Sequenzen bestehen aus 1 bis 6 Basenpaaren. Es wird angenommen, dass hunderte bis tausende von Mikrosatelliten Loci im humanen Genom, gewöhnlich im Intron oder in der nicht translatierten 5' oder 3' Exonregion, lokalisiert sind. Tumoren mit MSI werden als Mikrosatelliten instabil oder "replication error positive" (RER+) bezeichnet. MSI wurde

zuerst im hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) entdeckt. Hier fand sich eine hohe Frequenz von Keimbahn Mutationen in Mismatch-Repair Genen bei Verwandten, speziell in hMSH2 (31% der Fälle) und hMLH1 (33% der Fälle). Inaktivierende Mutationen von hMSH2 und hMLH1 und ihre fehlende Expression wurden auch bei einer Vielzahl von anderen sporadischen epithelialen Tumoren gezeigt. So z.B. auch beim Endometrium- und Ovarialkarzinom, dem klein- und nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, Pankreas- und Magenkarzinom, sowie beim Cervixkarzinom und Mammakarzinom (Risinger, JI, Berchuck, A et al., 1994, Merlo, A, Mabry, M et al., 1994, Shridar, V, Siegfried, J et al., 1994 und Han, H-J, Yanagisawa, A et al., 1993).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die systemische Cisplatin enthaltende Chemotherapie kann über 90% der Patienten mit einem fortgeschrittenen, metastasierten Keimzelltumor heilen. In 10-15% der Fälle trifft man allerdings auf eine Chemoresistenz. In vorrangegangenen Untersuchungen wurde auf die Frage der Chemoresistenz bei Tumoren eingegangen. Insbesondere die Arbeitsgruppe von Fink,D und Aebi,S et al. 1998 ging dieser Fragestellung nach.

Bei Zellen, die Defekte im MMR aufweisen, hat man eine Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapien entdeckt. So z.B. methylierende Substanzen wie Procarbazin und Temozolomid, alkylierende Substanzen wie Busulfan, Cisplatin und Carboplatin, der Antimetabolit 6-thioguanin und die Topoisomerase II Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin.

Die Chemoresistenz entsteht dadurch, dass die Zelle nicht in der Lage ist, einen DNA Schaden zu korrigieren, und im nächsten Schritt die Apoptose einzuleiten. Am bekanntesten ist wohl der Verlust des MMR Systems bei dem hereditären nicht polypösen Colon Karzinom (HNPCC).

Die DNA ist der Hauptangriffsort von Substanzen wie Cisplatin. In der Literatur konnte unter in-vitro Bedingungen nachgewiesen werden, dass die MMR entscheidend in die Ausbildung der cisplatin- und etoposid- assoziierten Chemotherapie involviert sind. Die MMR wirken dabei als Detektoren der chemotherapeutisch ausgebildeten DNA-Addukte und induzieren über den c-Jun und c-Abl Pathway eine Apoptose. Ein Verlust der MMR

Einleitung

bewirkt eine fehlende Erkennung der DNA-Addukte, so dass die Apoptose nicht eingeleitet werden kann.

Es wird berichtet, dass ein Defekt in den Mismatch-repair Genen ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie bewirken kann. Allerdings handelt es sich dabei um das Colon Karzinom und um eine Therapie mit Fluorouracil (Ribic, CM, Sargent, DJ et al., 2003).

Bei den testikulären Keimzelltumoren hat man die genetische Instabilität bislang kaum bewertet. Diese ist aber mit Blick auf vorhandene cisplatin- und etoposid- assoziierte Chemoresistenz bei testikulären Keimzelltumoren interessant.

In der vorliegenden Untersuchung soll der Zusammenhang zwischen einem Defekt der Mismatch Repair Gene und einem nicht Ansprechen auf systemische Chemotherapie gezeigt werden. Zudem wird die Verteilung der MMR im Hoden und den verschiedenen Formen der Spermatogenese in einer neueren Studie betrachtet (Heidenreich, A, Peitgen, E, et al, 2006)

2 Material und Methoden

2.1 Material

Es wurden insgesamt 27 Hodentumoren sowie Lymphknoten unterschiedlicher Histologie sowie Klassifikation untersucht. Zur internen Kontrolle diente, wenn vorhanden, das angrenzende Normalgewebe. Das in Paraffinblöcken eingebettete Gewebe stammt aus dem Institut für Pathologie der Philipps Universität Marburg, mit freundlicher Genehmigung von Direktor Professor Dr. Moll. Es handelte sich dabei um primäre Hodentumoren, sowie um Lymphknoten, die bei einer sekundären retroperitonealen Lymphknotenausräumung (RPLA) gewonnen wurden, also Residuallymphome nach erfolgter induktiver Chemotherapie. Das Gewebe stammt von Patienten, die in der Zeit von 1989 bis 2002 in der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Marburg behandelt wurden. Anhand von Krankenakten wurden Tumorstadium, eventuelle Metastasierung, erhaltene Chemotherapie und, falls vorhanden, RPLA ermittelt. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Orchiectomie betrug 32 Jahre. Der jüngste Patient war 25, der älteste Patient war 51 Jahre alt. Es handelte sich um 8 Seminome, 5 Mischtumoren (bestehend aus mindestens zwei oder mehr Histologien), 1 embryonales Karzinom, jeweils 1 Teratokarzinom (embryonales Karzinom mit Teratom), 6 reife Teratome und 1 unreifes Teratom und schließlich 2 Teratome (ohne Reifeklassifikation), 2 Teratome mit reifen bzw. unreifen Anteilen und 1 Probe mit vitalem Tumorrest (siehe Tabelle 4.1), also insgesamt 27 Proben. In 4 Fällen bestand ebenfalls eine sogenannte TIN.

2.1.1 Antikörper und Konjugate

Die folgende Tabelle stellt die benutzten Antikörper zusammen.

Tabelle 2.1:

Primär-Antikörper	Spezifität	Referenz	Hersteller
MLH1	Humanes und murines MLH1	Cleaver, J.E. It was a very good year for DNA repair. <i>Cell</i> 76:1-4, 1994 Prolla, T.A., <i>et al.</i> MLH1, PMS1, and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast. <i>Science</i> 265: 1091-1093, 1994	BD PharMingen

Material und Methoden

MSH2	Humanes und murines MSH2	Leach, F.S., Nicolaides, N.C., <i>et al.</i> Mutations of a <i>mutS</i> Homolog in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. <i>Cell</i> 75: 1215-1225, 1993 Thibodeau, S.N. <i>et al.</i> Altered Expression of <i>hMSH2</i> and <i>hMLH1</i> in Tumors with Microsatellite Instability and Genetic Alterations in Mismatch Repair Genes. <i>Cancer Res.</i> 56:4836-4840, 1996.	Oncogene Research Products, Boston, MA USA
Sekundär-Antikörper			
Dako EnVision Labelled Polymer, Alkalische Phosphatase	Ziege-anti-Maus IgG und Ziege-anti-Kaninchen IgG		Dako Corporation, Carpinteria, CA USA

Bei dem MLH1 Primärantikörper handelte es sich um einen aus Mäusen entwickelten monoklonalen Antikörper, der positiv mit MLH1 in Mäusen und Menschen reagiert. Der MSH2 Primärantikörper war ebenfalls ein aus Mäusen entwickelter monoklonaler Antikörper, der mit MSH2 in Maus und Mensch positiv reagiert.

2.1.2 Chemikalien

3'3-Diaminobenzidin in chromogener Lösung (DAB Chromogen).

Hierbei handelt es sich um ein Peroxidasesubstrat, das ein in Alkohol unlösliches braunes Endprodukt bildet. Es dient der Darstellung von Antigenstrukturen in Gefrierschnitt- und Paraffinschnitten in der Immunhistochemie.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.2

PBS	0.14 M NaCl
	0,9 mM KH ₂ PO ₄
	8,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O

Als PBS bezeichnet man eine Puffer-Zubereitung, die Hydrogenphosphat und Dihydrogenphosphat in einer 0,9% Kochsalz-Lösung enthält. PBS puffert in einem pH-Bereich von 7,4 und kommt häufig bei der Pufferung biochemischer Reaktionen zum Einsatz.

Tabelle 2.3

TBS	NaCl 53g
	Tris 12g

TBS wird bei immunhistochemischen Färbungen benutzt, wenn man mit Hintergrundfärbungen rechnen kann. TBS kann auch bei der Verdünnung von Antikörpern benutzt werden.

Tabelle 2.4

Target Retrieval- Puffer	0,01 M Citratpuffer
---------------------------------	---------------------

Es handelt sich um einen modifizierten Citratpuffer mit einem pH von 6.1.

Tabelle 2.5

Saures Hämatoxylin nach Mayer:	Hämatoxylin 1,0g
	NaJO ₃ 0,2g
	Kalialaun 50,0g
	Chloralhydrat 50,0g
	Zitronensäure 1,0g
	H ₂ O ad 1000ml

Wässrige Eosinlösung 1% Eosin-Y (Y= „yellow“ Eosin) in 100ml A. dest., einen Tropfen Eisessig hinzugeben.

2.1.4 Sonstige Materialien

Materialien, die zur Herstellung der Schnitte, sowie der immunhistochemischen Behandlung dienen.

Tabelle 2.6

Rotationsmikrotom	Leitz, Wetzlar
Objektträger (Super Frost)	Merck, Darmstadt
Dampfgerar (Multi Gourmet)	Braun
Entellan	Merck, Darmstadt

2.1.4 Gewebe

Die zu untersuchenden Präparate wurden mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Marburg, Direktor Professor Dr. med. R. Moll, bezogen. Es handelte sich um in Paraffin eingebettete Hodentumoren, die durch inguinale Orchiektomie von Patienten gewonnen wurde. Die untersuchten Lymphknotenpräparate wurden durch die retroperitoneale Lymphadenektomie entfernt. Es wurden 15 Hodentumoren, sowie 12 Lymphknotenpräparate unterschiedlicher histologischer Klassifikation untersucht. Idealerweise stammten die Hodentumor- und Lymphknotenpräparate vom gleichen Patienten. Leider war dies in einigen Fällen nicht möglich, da entweder Primärtumor oder Lymphknotenpräparat sich nicht in der Pathologie befanden. Die Histologie bei diesen fehlenden Präparaten ist jedoch bekannt und konnte insofern darüber Aufschluss geben, dass eine Chemotherapie bei diesen Patienten nicht zur Remission geführt hat.

Tumorhistologie, Tumorstadium, Metastasierung sowie durchgeführte Therapien des Patientenkollektivs konnten anhand der Krankenakten ermittelt werden.

2.2 Methoden

In diesem Abschnitt soll auf die einzelnen Arbeitsschritte von der Einbettung des Tumorgewebes, Herstellung der Paraffinschnitte und der anschließenden Hämatoxylin-Eosin-Färbung gesprochen werden. Der zweite Abschnitt des Methodenteils soll sich den

immunhistochemischen Methoden und deren Durchführung widmen. Im letzten Teil werden die Dokumentation und die Computerunterstützte Auswertung besprochen.

2.2.1 Einbettung

Das Tumorgewebe wird mit Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingegossen. Diese Schritte erfolgen im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Marburg.

2.2.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Es werden ca. 5µm dünne Paraffinschnitte mit einem Rotationsmikrotom hergestellt. Die Paraffinschnitte werden anschließend in ein auf ca. 50°C erwärmtes Wasserbad übertragen, um ein Strecken der Schnitte zu erreichen. Im nächsten Schritt werden die Schnitte auf sialinisierte Objektträger (Super Frost, Merck) gebracht. Sialinisierte Objektträger verhindern ein „Abschwimmen“ der Schnitte. Die Schnitte trocknen über Nacht in einem Trockenschrank bei 60°C. Sowohl für die Hämotoxylin-Eosin Färbung als auch für die Immunhistochemie werden die Schnitte entparaffiniert. Die Schnitte kommen zunächst für 3x5min in Xylol, anschließend in eine absteigende Alkoholreihe beginnend mit 100%, dann 96%, 80% und 70%igem Alkohol jeweils für 3min und zuletzt für 5min in Aqua dest., um eine Rehydrierung zu erreichen. Im Anschluß daran kann nun die Färbung nach HE oder die Immunhistochemie folgen. Nach den Färbungen werden die Schnitte wieder dehydriert, um letztendlich mit Entellan (Merck) eingedeckt zu werden. Die Dehydrierung, bzw. Entwässerung erfolgt durch kurzes Spülen mit 70%igem sowie 96%igem Alkohol. Im Anschluss kommen die Schnitte für 2x5min in 100%igem Alkohol. Jetzt müssen die Schnitte noch einmal 3x5min in Xylol entwässern bevor sie mit Entellan eingedeckt werden.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Von jedem Tumorblock muss zur Begutachtung vor der Immunhistochemie eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung angefertigt werden. Diese HE gefärbten Schnitte werden von dem Pathologen Professor apl. Dr. Barth (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Marburg) begutachtet. Zunächst ist entscheidend, ob sich auf den hergestellten Objektträgern tatsächlich Tumorgewebe befindet. Wenn von einem Tumorblock 30 Schnitte hergestellt werden, kann es passieren, dass sich auf dem 31. Anschnitt kein Tumorgewebe mehr befindet. Anschließend wird die histologische Differenzierung bestätigt oder revidiert.

Eine Hämatoxylin-Eosin Lösung hat folgende Zusammensetzung. Hämatoxylin ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff. Er färbt daher negativ geladene („basophile“) Strukturen blau, z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen („Azidophilie“) (Histonet 2000).

Nachdem die Schnitte, wie oben beschrieben, rehydriert worden sind, kommen sie für 10min in Hämatoxylin. Im Anschluß werden die Schnitte für ca. 5min in Leitungswasser gegeben („Bläuen“ der Schnitte). Anschließend folgt die Färbung der Schnitte in Eosin für 3-5min. Die Schnitte werden kurz mit A. dest. abgespült, dann folgt die Entwässerung mit 70%, 96% sowie 100%igem Alkohol für je 3min. Nachdem die Schnitte noch für 3x5min in Xylol entwässern, werden sie mit Entellan eingedeckt. Dieser letzte Schritt dient der Konservierung der Objektträger.

2.2.4 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie dient zum Nachweis bzw. zur Identifizierung bestimmter Strukturen oder Stoffe in Gewebeschnitten, wenn deren Abgrenzung nach Färbung mit herkömmlichen Methoden, z.B. der HE Färbung, nicht möglich ist. Zu den Strukturen, die man so darstellen kann, gehören Zellen, Enzyme, Hormone, Makromoleküle wie Nukleinsäuren. Die Grundlage immunhistochemischer Färbemethoden ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. So lassen sich z.B. verschiedene Zellen in einem Gewebe anhand

unterschiedlicher Stoffwechselprodukte oder Oberflächen voneinander unterscheiden. Als Antigen dient in diesem Fall entweder das Stoffwechselprodukt oder ein bestimmter zellulärer Oberflächenbestandteil. Im ersten Schritt lässt man das Antigen mit einem spezifischen Primärantikörper reagieren. Der so gebildete Antigen-Antikörper-Komplex ist jedoch unsichtbar. In einem weiteren Schritt wird deshalb ein zweiter Antikörper eingesetzt („Sandwich-Verfahren“), der sogenannte Sekundär Antikörper, dieser ist gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet. An den zweiten Antikörper ist entweder direkt ein Farbstoff oder ein Enzym gekoppelt. Eine Substrat-Lösung, wie das DAB Chromogen macht die Reaktion anschließend sichtbar. Durch die Formalin-Fixierung kann es zur Ausbildung von Eiweiß Verbindungen kommen, durch die die Bindungsstellen der Antigene versteckt sein können; dies bezeichnet man auch als sogenannte „Maskierung von Antigen“. Deshalb hat sich die Methode der Antigendemaskierung mit sog. „antigen retrieval reagents“ durchgesetzt. Bei dieser Technik müssen die Paraffinschnitte für eine gewisse Zeit Hitze und einer wässrigen Lösung, der Retrieval Solution ausgesetzt werden. Dieser Prozess nennt sich Heat Induced Epitope Retrieval (HIER). In dieser Arbeit wurde die Target Retrieval Solution von Dako benutzt. Die Schnitte wurden bei 94°C in einem Dampfgerat erhitzt.

Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbungen wurden die rehydrierten Gewebeschnitte in 1xPBS mit 2% Magermilchpulver geblockt. Die Hauptursache für die unspezifische Hintergrundaktivität kommt durch hydrophobe und elektrostatische Ladungen zustande, die zu unspezifischen Bindungen an Antikörpern führen können.

2.2.5 Durchführung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte werden wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Anschließend werden sie 5min in 1xPBS (Roche) gewaschen. Um die endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes zu eliminieren, werden die Gewebeschnitte für 20min in 1xPBS mit 3% Wasserstoffperoxid inkubiert und im Anschluss 3x5min in 1xPBS gewaschen. Dann erfolgt die Behandlung der Schnitte mit der Target Retrieval Solution bei pH 6,1 (Dako). Dazu werden die Schnitte für 30min im Dampfgerat bei 94°C erhitzt. Danach kühlen sie 20Min bei Raumtemperatur ab. Die Schnitte wurden erneut 3x5min in 1xPBS gewaschen. Anschließend werden die

Gewebeschnitte „geblockt“. Die Schnitte werden für 20min in 1xPBS mit 2% Magermilchpulver (Roche) inkubiert. Die anschließende Behandlung der Schnitte mit den primären und sekundären Antikörpern, sowie die DAB Reaktion erfolgen in der feuchten Kammer. Die Verdünnungen der Primärantikörper von MLH1 und MSH2 betragen bei MLH1 1:100 sowie 1:200, bei MSH2 1:100 und 1:250. Verdünnt werden die Primärantikörper mit dem Antibody Diluent von Dako. Die Gewebeschnitte werden jeweils für 30Min mit den Primärantikörpern inkubiert. Anschließend werden sie 3x5Min in 1xTBS gewaschen. Als nächstes erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Der Einsatz eines Sekundärantikörpers erhöht die Ausbeute an Antikörper-Antigen Bindungen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper dauert 30Min. Danach erfolgt erneutes Waschen für 3x5min in TBS. Anschließend erfolgte die Behandlung mit der Substratlösung 3,3'-Diaminobenzidin. Die Einwirkung der Substratlösung muss im Dunklen stattfinden, für die Einwirkdauer hat sich die Zeit von 10min als am günstigsten erwiesen. Die Reaktion wird durch kurzes Spülen mit A.dest abgestoppt. Die Schnitte werden im letzten Schritt 1 bis 2Min mit Mayers Hämalaun (Merck) gegengefärbt. Zum Bläuen bleiben sie für 1 bis 2Min in Leitungswasser, anschließend erfolgt die wie oben beschriebene Dehydrierung und das Eindecken mit Entellan (Merck).

2.3 Dokumentation

Zur digitalen Dokumentation der immunhistochemischen Färbungen wurde ein binokuläres Photomikroskop (Leitz) verwendet. Die aufgenommenen digitalen Bilder wurden in das Programm Qwin (Leica) übertragen.

2.4 Computerunterstützte Auswertung

Die Auswertung mit der Hilfe eines Computers hat den Vorteil, dass dadurch ein hohes Maß an Objektivität erreicht wird. Die digitale Auswertung erlaubt eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung, unabhängig vom Untersucher. Es handelt sich um das System Q500MC (Leica). In dieser Arbeit wurde die Fläche der immunhistochemisch gefärbten Areale in μm^2 gemessen und als Prozentwert der Gesamtumorfläche ausgedrückt (Fontanini G, Calcinai A et al., 1999). Dabei können sich Fehler in der Auswertung ergeben. Auch wenn das Protokoll der Immunhistochemie streng eingehalten wird, kann nicht immer eine exakt gleiche Färbeintensität erreicht werden. Denn z.B. können bei der Gewinnung von Schnitten unterschiedliche Schnittdicken auftreten. Da dickere Schnitte aber auch ein größeres Volumen haben, besitzen sie auch eine stärkere Färbung. Bei der digitalen Auswertung ist es wichtig, auf möglichst gleichbleibende Lichtverhältnisse zu achten. Eine interaktive, computer-gestützte Auswertung liefert die sichersten Ergebnisse. Dies bedeutet, dass der Untersucher über die Richtigkeit der Auswahl der gefärbten Areale entscheidet. Die im Anschluss stattfindende Messung der individuellen Auswahl wird durch den Computer geleistet. Hier wiederum könnte das Problem der subjektiven Beurteilung durch den Untersucher vorliegen, da aber vor der Versuchsdurchführung festgelegt wurde, dass alle durch DAB braun gefärbten Areale zu messen sind, und die Untersuchungen immer von der gleichen Person ausgeführt wurden, sind die Fehler vergleichsweise gering.

Dem digitalen Bildauswertungssystem Qwin (Leica) liegt die Software Qwin zugrunde. Dabei handelt es sich um ein Computerprogramm zur digitalen Bilderfassung, Bearbeitung und Auswertung. Es bietet die Möglichkeit, Bilder von einer Videokamera in verschiedenen Bildgrößen und Farbkodierungen einlesen zu lassen. Auch kann eine automatische Ausleuchtungskorrektur vorgenommen werden, die bei ungleichmäßig ausgeleuchteten Gewebeschnitten dazu führt, dass das zu bearbeitende Bild nach dem Einlesen eine gleichmäßige Ausleuchtung aufweist. Die so erhaltenen Bilder können nun bearbeitet werden. Für die Auswertung störende Areale können aus der Auswertung herausgenommen, wichtige einbezogen werden. Als Beispiel wäre ein Teratom zu nennen. Wenn man die Karzinomzellen auswerten lassen möchte, sollte man möglichst die zellfreien Hohlräume aus der Wertung herausnehmen, da es sonst zu falsch negativen

Ergebnissen kommen würde. Die Hauptfunktion des Programms ist das Erkennen bestimmter Farben, deren Markierung und anschließende Auswertung. Die erkannten Farben entsprechen, je nach Einstellung, bestimmten Strukturen in dem zu untersuchenden Präparat. So kann etwa die Farberkennung auf dunkelbraun eingestellt werden, womit alle DAB-gefärbten Areale, in diesem Fall MLH1 und MSH2 positive Zellen erkannt werden.

2.4.1 Ablauf der Auswertung

Das Programm für die Messung der mit Anti-MLH1 und Anti-MSH2-Antikörpern durchgeführten Färbungen lässt sich in zwei Schritte einteilen. Einscannen und Abspeichern der einzelnen Bildausschnitte eines Präparats sowie die anschließende Auswertung. Dazu muss die am Mikroskop eingestellte Vergrößerung mit der in der Programmeinstellung übereinstimmen. Die Anzahl der eingescannten Bildausschnitte war nicht begrenzt. Bei dieser Arbeit wurden jeweils 5-10 Bildabschnitte des Tumorgewebes und 10 Bildabschnitte des Normalgewebes, falls vorhanden, ausgewählt. Nach Eingabe bzw. Einlesen der einzelnen Bildausschnitte wurden die Einzelergebnisse sowie das Gesamtergebnis der Auswertung an das Datenverarbeitungsprogramm Microsoft-Excel übermittelt.

Die Auswertung lässt sich in zwei Bereiche gliedern. Die Berechnung der gefärbten Fläche sowie die Berechnung des tatsächlichen Stromaanteils. Mit dem Erscheinen des ersten Bildausschnitts wurde der Farbbereich ausgewählt, der alle relevanten mit DAB-gefärbten Anteile (Braunwerte) umfasst (Threshold). Dazu wurden drei verschiedene Werte festgelegt: Die Werte für Rot, Grün und Blau.

Unter Beibehaltung dieses einmal ausgewählten Braunwertes werden alle zukünftigen Präparate ausgewertet. Das Programm markiert nun diese als braun erkannten Anteile. Dabei kann es vorkommen, dass neben den Tumorzellen auch Artefakte markiert werden. Im nächsten Schritt können diese „falschen“ Markierungen aus der Wertung genommen werden. So wäre dies bei einem reifen Teratom der Inhalt von Zysten oder auch das umliegende nichttumoröse Gewebe. Dazu umfährt man die entsprechenden Areale mit der „Maus“, diese werden blau markiert und im Anschluss berechnet. Nach Auswertung des letzten Bildausschnitts erfolgt die Übertragung in eine Excel Tabelle.

Material und Methoden

Innerhalb der Excel Tabelle besteht die Auswertung aus folgenden Anteilen. Jedes Einzelergebnis, bestehend aus der Auswertung eines Bildausschnittes wird festgehalten. Dieses Einzelergebnis besteht aus der Gesamtfläche und der Positivfläche in μm^2 . Die Gesamtfläche ist die Fläche, die der Untersucher festgelegt hat, in dem er dem Programm vorgibt, was relevant ist und in die Auswertung gelangen soll. Die Positivfläche ist dann der Anteil der markierten Fläche, also die von dem Programm erkannten Braunfärbungen an der Gesamtfläche. Wenn die erforderliche Anzahl an Bildausschnitten bearbeitet worden ist, beendet man das Programm. Mit Beendigung errechnet das Programm automatisch die Gesamtergebnisse indem es alle Einzelergebnisse aufsummiert.

Tabelle 2.7

Beispiel eines Auswertungsvorgangs mit dem Programm Qwin. Die einzelnen Ergebnisse sowie das Gesamtergebnis werden automatisch in eine Excel (Microsoft) Tabelle übertragen.

Einzelergebnis Bild-Nr : 1	Gesamtfläche : 6.1152e+005 μm^2	Positivfläche : 1.2475e+005 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 2	Gesamtfläche : 4.7880e+005 μm^2	Positivfläche : 1.0252e+005 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 3	Gesamtfläche : 2.7795e+005 μm^2	Positivfläche : 68724.2969 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 4	Gesamtfläche : 1.6628e+005 μm^2	Positivfläche : 33390.6055 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 5	Gesamtfläche : 3.7384e+005 μm^2	Positivfläche : 83071.2734 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 6	Gesamtfläche : 2.7853e+005 μm^2	Positivfläche : 59478.3555 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 7	Gesamtfläche : 5.0169e+005 μm^2	Positivfläche : 72437.4141 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 8	Gesamtfläche : 4.6381e+005 μm^2	Positivfläche : 85074.3359 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 9	Gesamtfläche : 2.1655e+005 μm^2	Positivfläche : 53909.5391 μm^2
Einzelergebnis Bild-Nr : 10	Gesamtfläche : 4.2460e+005 μm^2	Positivfläche : 83090.1250 μm^2
Ergebnis:		
Gesamtfläche Tumor : 3.7936e+006 μm^2		
Gesamtfläche Positive : 7.6644e+005 μm^2		
Gesamtanteil Positive an Tumor : 0.2020	20.2037 %	

So erhält man einmal die „Gesamtfläche Tumor“, hier sind alle Einzelergebnisse der Gesamtfläche addiert worden. Bei der „Gesamtfläche Positive“ werden entsprechend alle als positiv erkannten innerhalb der Gesamtfläche aufsummiert. Der „Gesamtanteil Positive an Tumor“ sagt aus, wieviele insgesamt in der Gesamtfläche als positiv erkannt wurden, einmal als Zahl und einmal in Prozent. In dem obigen Fall sind also 20.2% der Gesamtfläche von dem Programm markiert worden, entsprachen also dem vom Untersucher vorher festgelegten Braunwert.

3 Bilddokumentation

In dem folgenden Abschnitt werden alle immunhistochemischen Anfärbungen dokumentiert. Neben der “positiven” Anfärbung findet sich auch eine “negative” Kontrolle. So soll gezeigt werden, dass es tatsächlich zu einer Immunreaktion mit den Primärantikörpern von hMLH1 und hMSH2 kam. Die negative Kontrolle soll zeigen, dass es nicht Zufall war, dass es zu einer Anfärbung kam. Das folgende Bild ist ein Beispiel aus der Serie der Aufnahmen. Es stellt eine Lymphknotenmetastase mit der Histologie eines unreifen Teratom mit embryonal karzinomatösen Anteilen dar. Hier in der Färbung gegen hMSH2. Zu jedem Bild gibt es eine Beschreibung, die folgende Unterpunkte enthält: welche Färbung, Metastase oder Primärtumor, Histologie sowie eine Erklärung zu den einzelnen sichtbaren Strukturen.



Abbildung 3.1

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem unreifen Teratom mit embryonal karzinomatösen Anteilen. (PID: 54217). Rechts sieht man Knorpel, links sieht man drüsige Anteile. A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine, bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

A →

B →

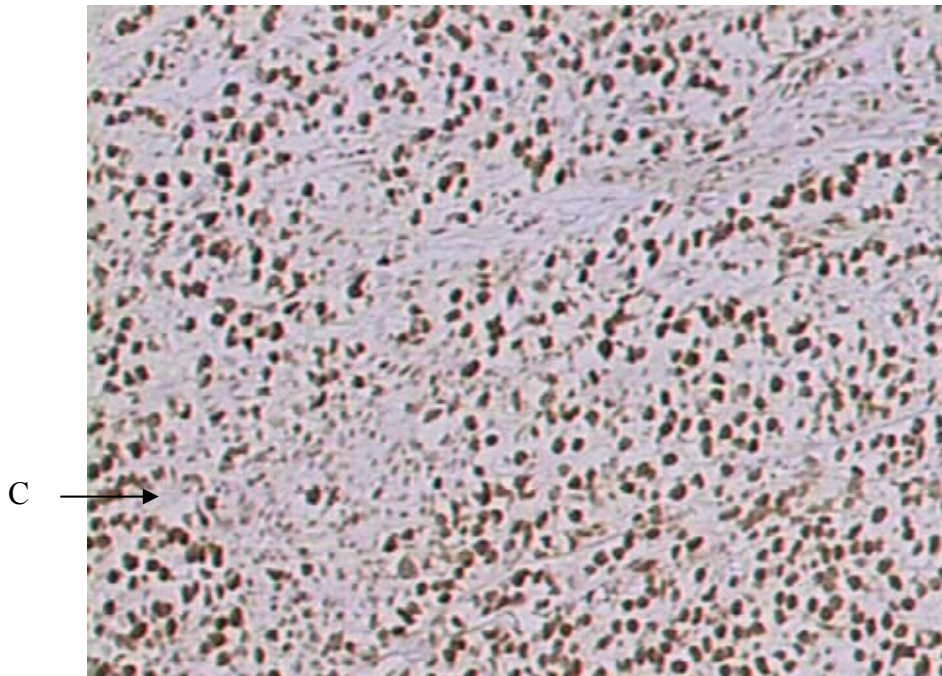


Abbildung 3.2

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (224991). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

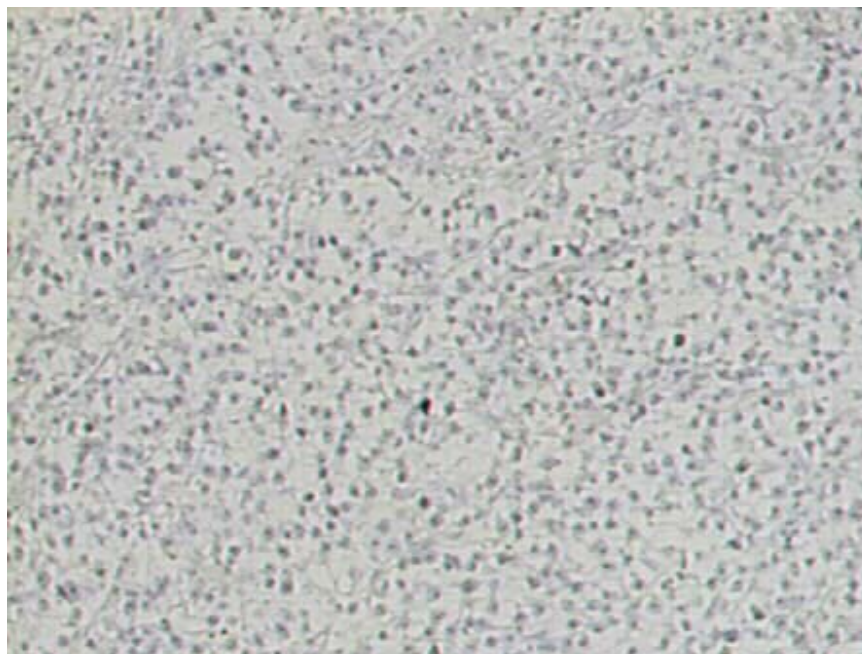


Abbildung 3.3

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.2 (224991). 10x Vergrößerung.

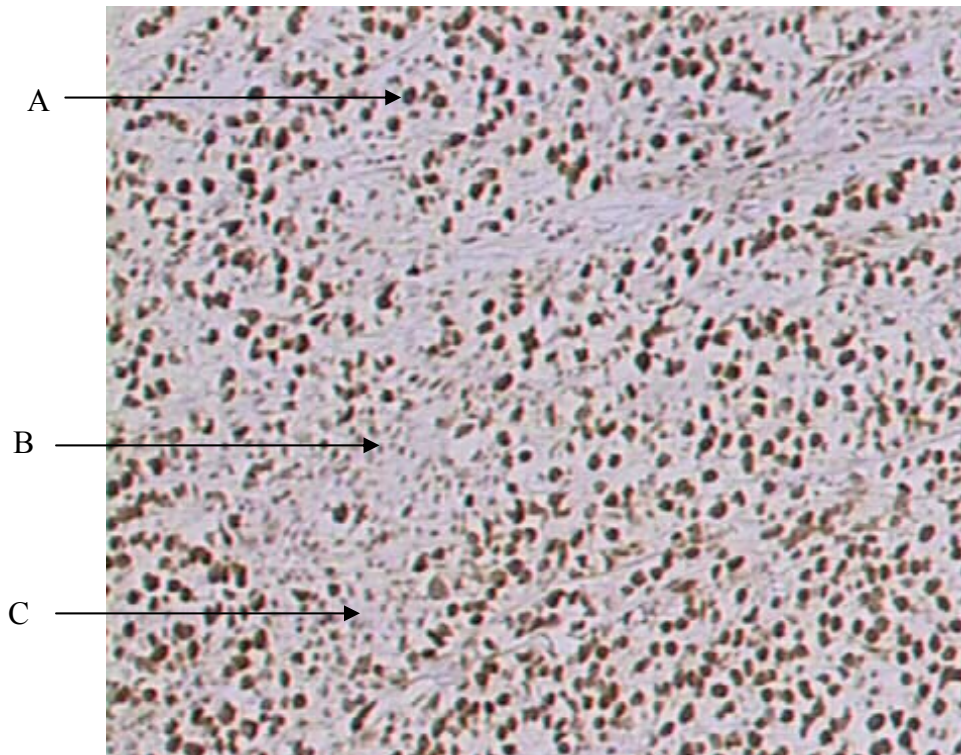


Abbildung 3.4

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (224991). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine 10x Vergrößerung.

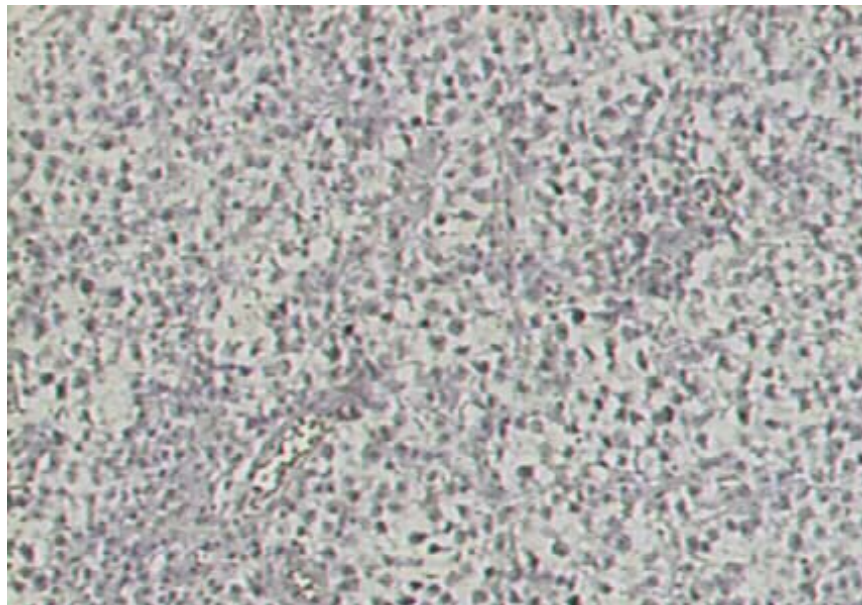


Abbildung 3.5

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.4 (224991). 10x Vergrößerung.

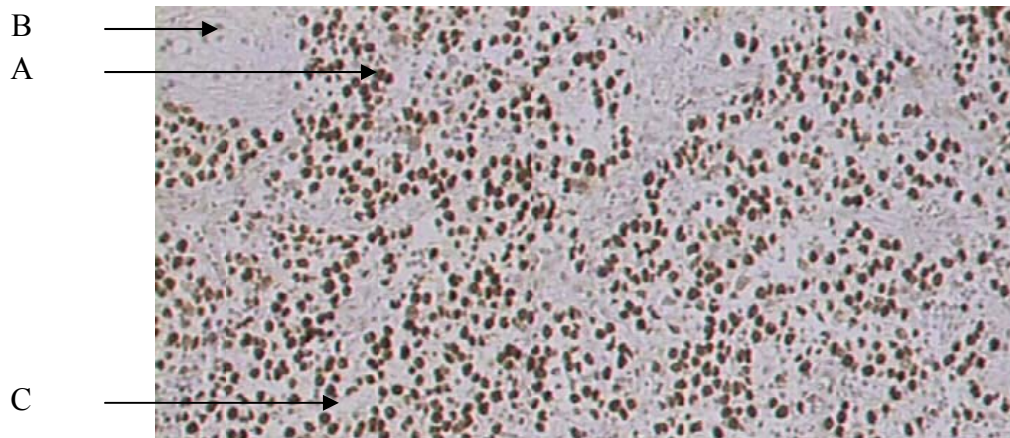


Abbildung 3.6

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (256121). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine 10x Vergrößerung.



Abbildung 3.7

40 fache Vergrößerung des klassischen Seminoms von Abbildung 3.6 (256121). A: Eine deutliche Kernanfärbung in den Tumorzellen ist zu erkennen.

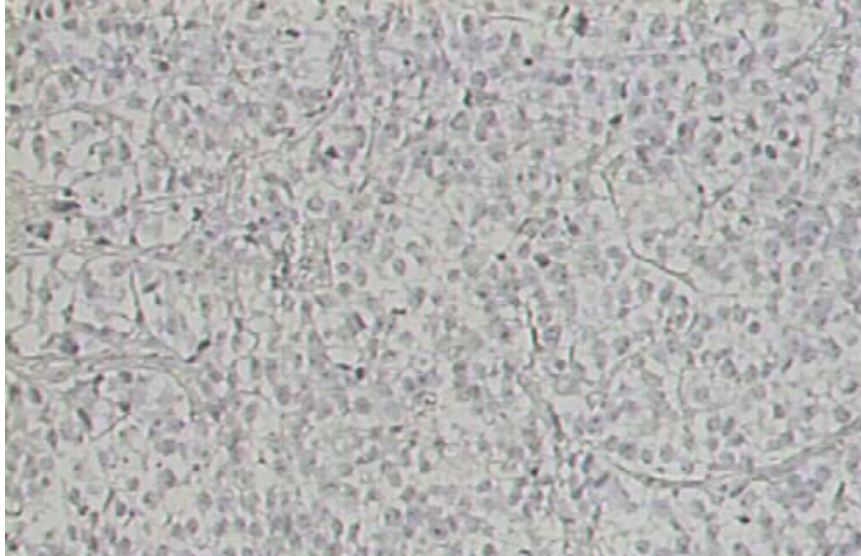


Abbildung 3.8

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.6 (256121). 10x Vergrößerung.

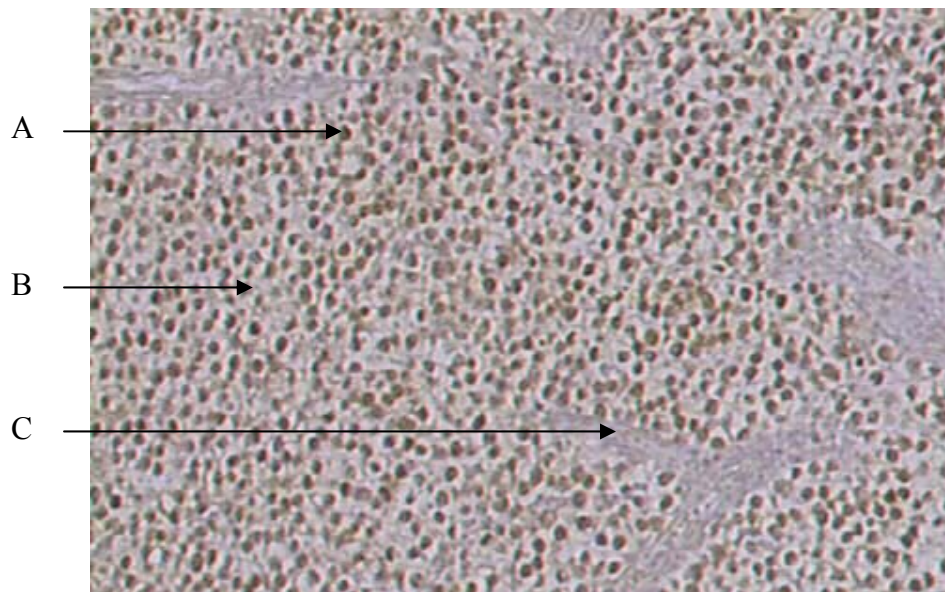


Abbildung 3.9

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (256121). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine 10x Vergrößerung.

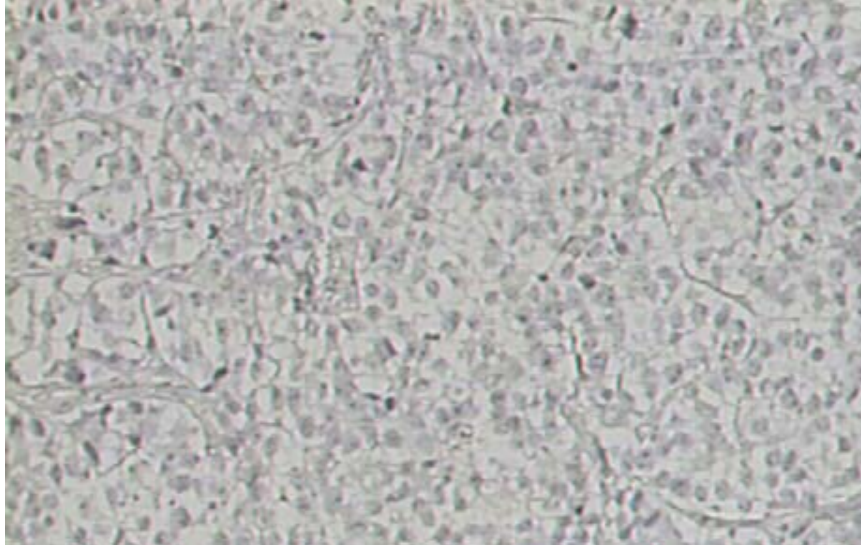


Abbildung 3.10

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.9 (256121). Mikroskopie 10x.

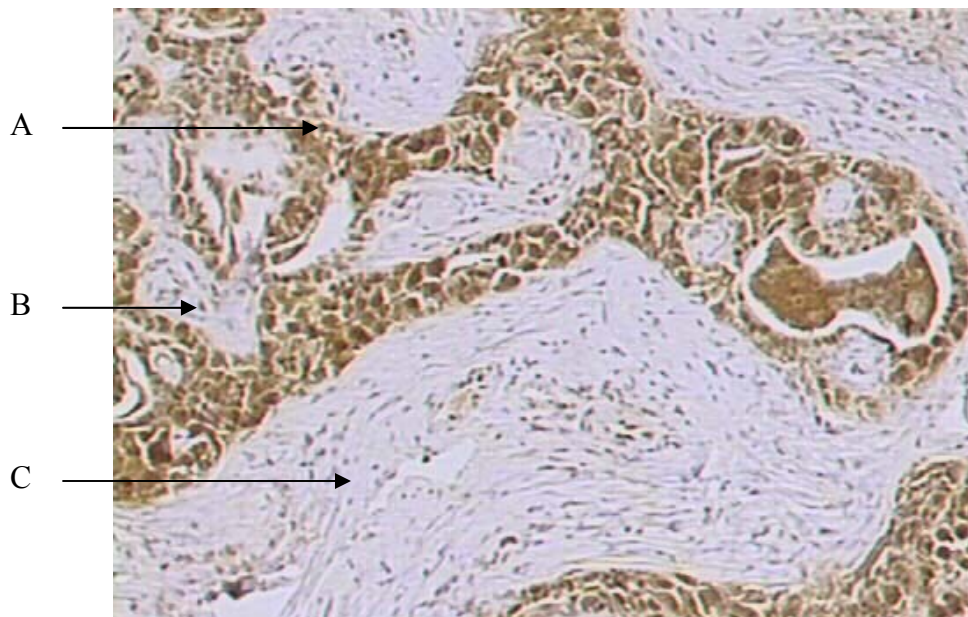


Abbildung 3.11

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (150397). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

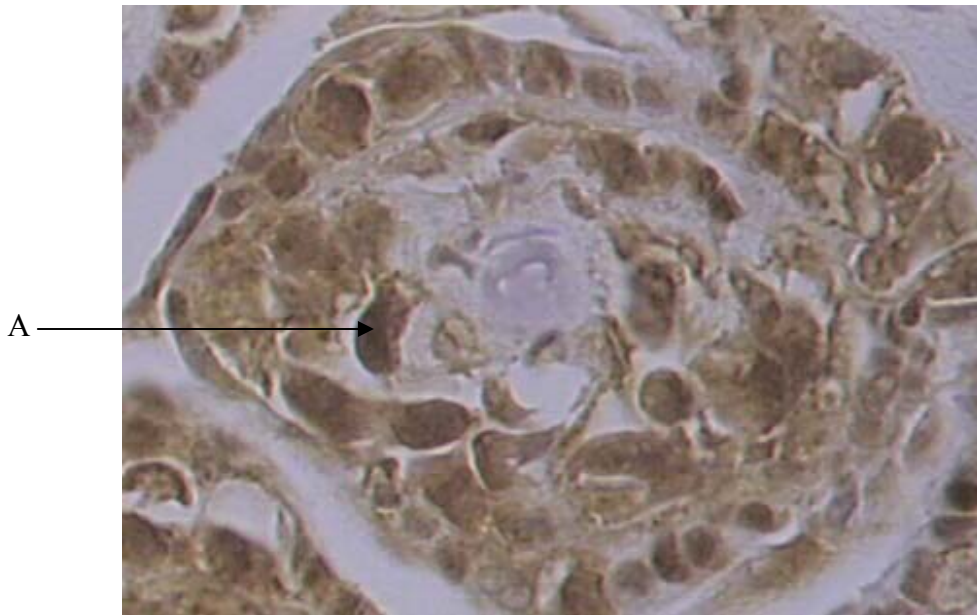


Abbildung 3.12

40 fache Mikroskopie des klassischen Seminoms von Abbildung 3.11 (150397). A: Eine deutliche Kernanfärbung in den Tumorzellen ist zu erkennen.

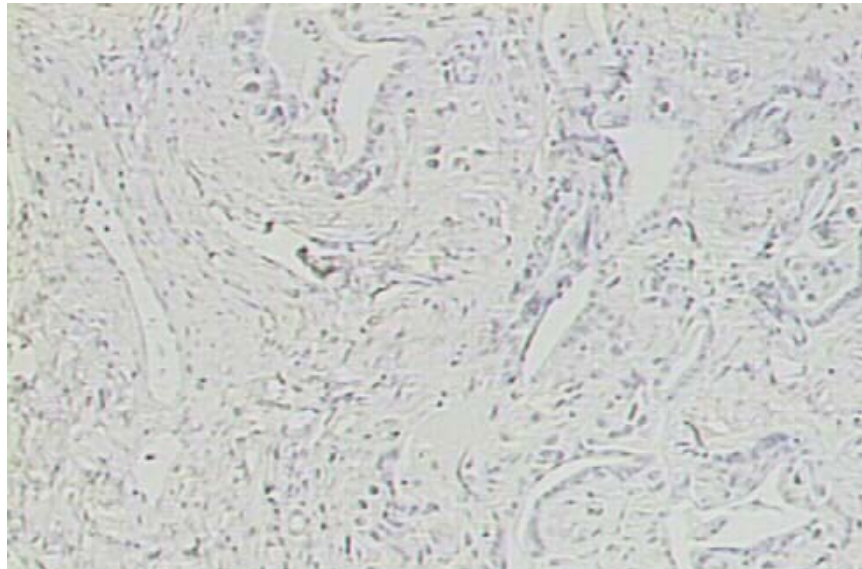


Abbildung 3.13

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.11 (150397). Mikroskopie 10x.

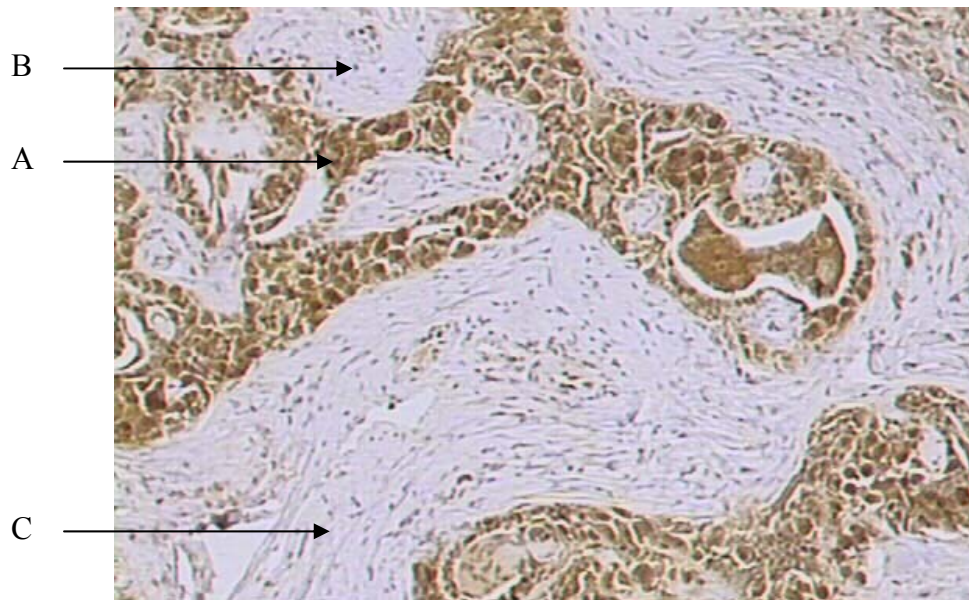


Abbildung 3.14

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (150397). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Mikroskopie 10x.

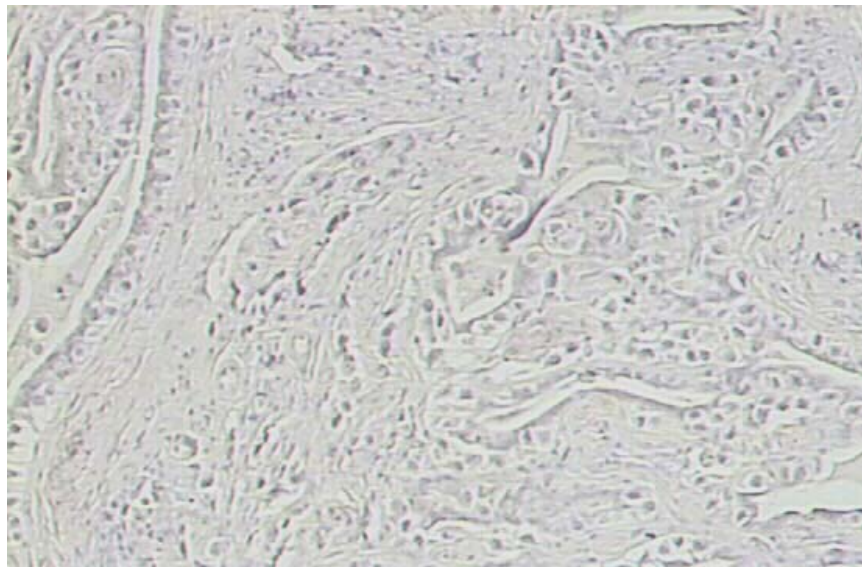


Abbildung 3.15

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.14 (150397). Mikroskopie 10x.

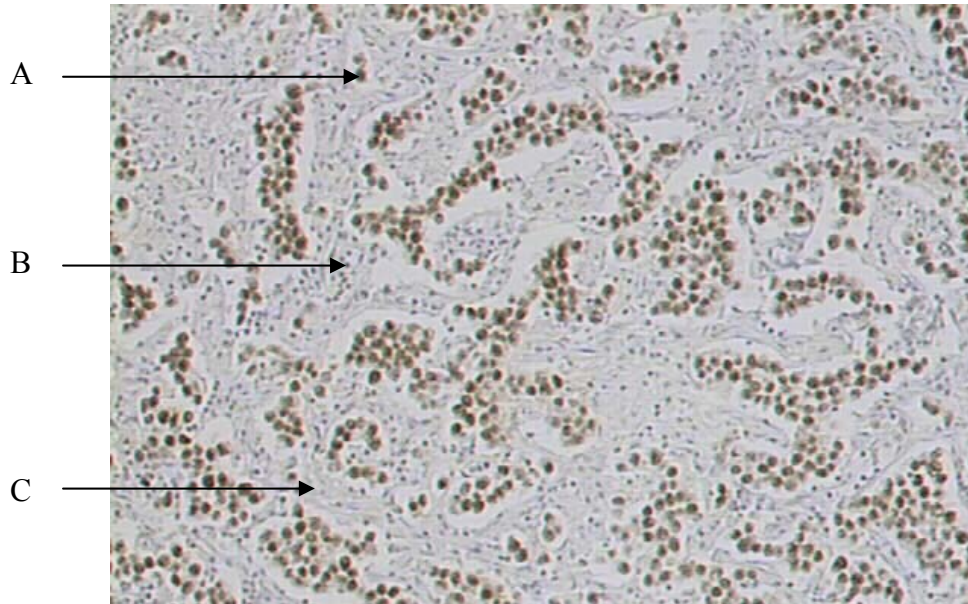


Abbildung 3.16

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (19385). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

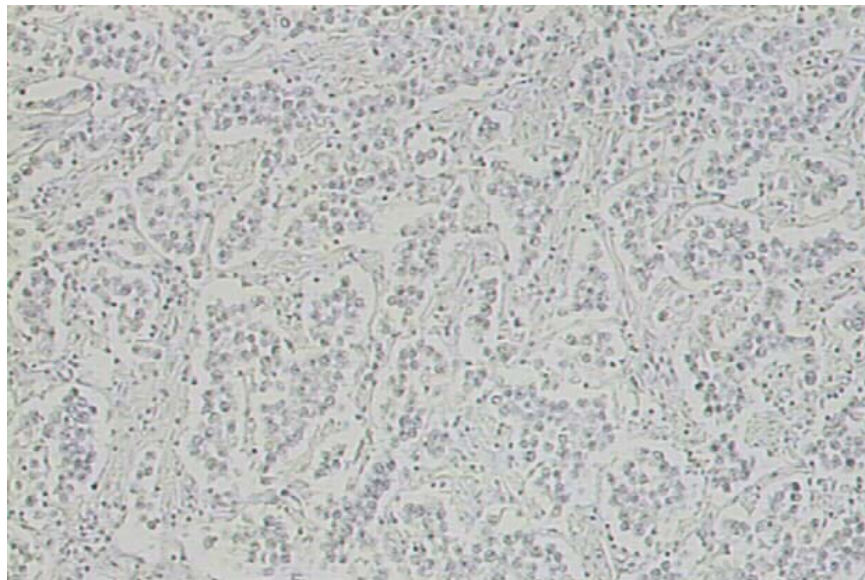


Abbildung 3.17

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.16 (19385). Mikroskopie 10x.

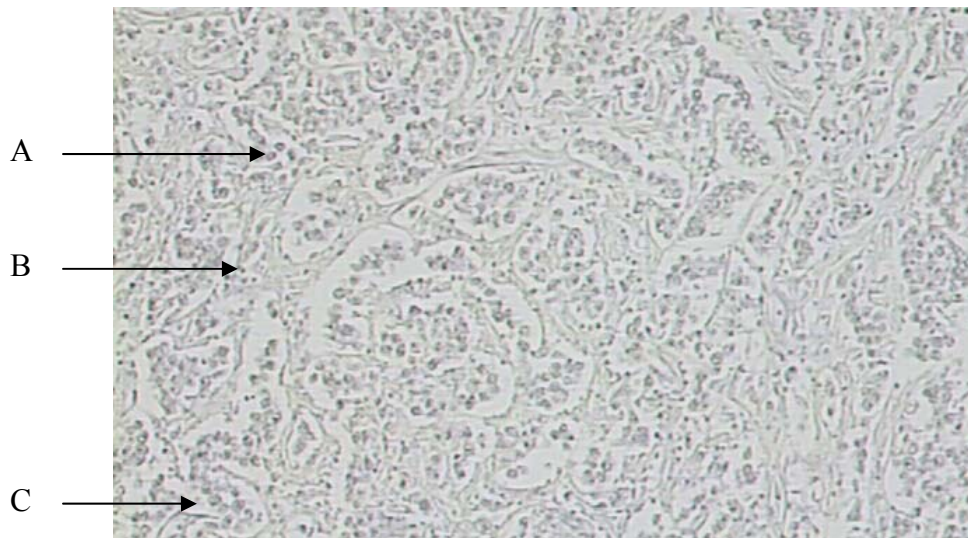


Abbildung 3.18

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (19385). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.19

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.18 (19385). Mikroskopie 10x.

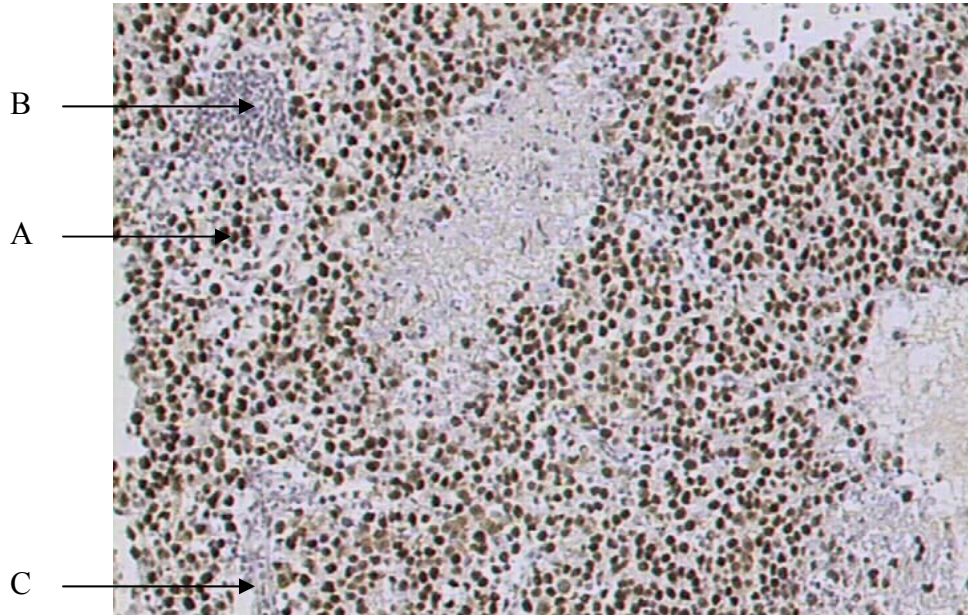


Abbildung 3.20

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (122025). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

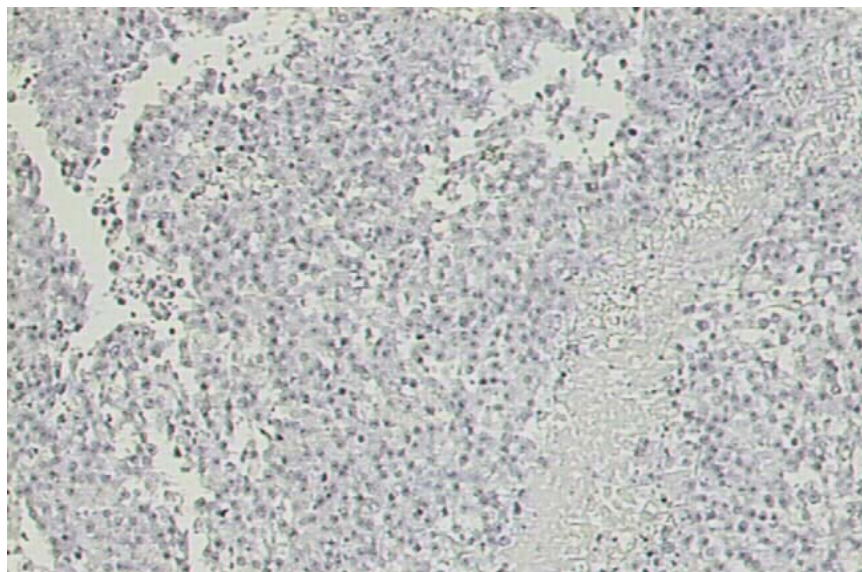


Abbildung 3.21

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.20 (122025). Mikroskopie 10x.

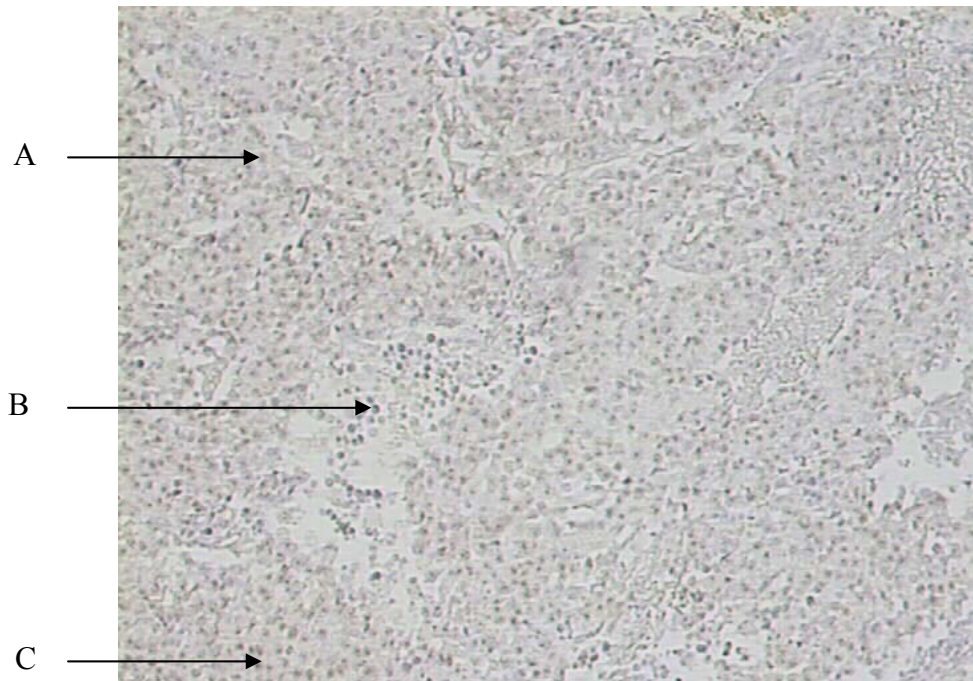


Abbildung 3.22

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (122025). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Mikroskopie 10x.

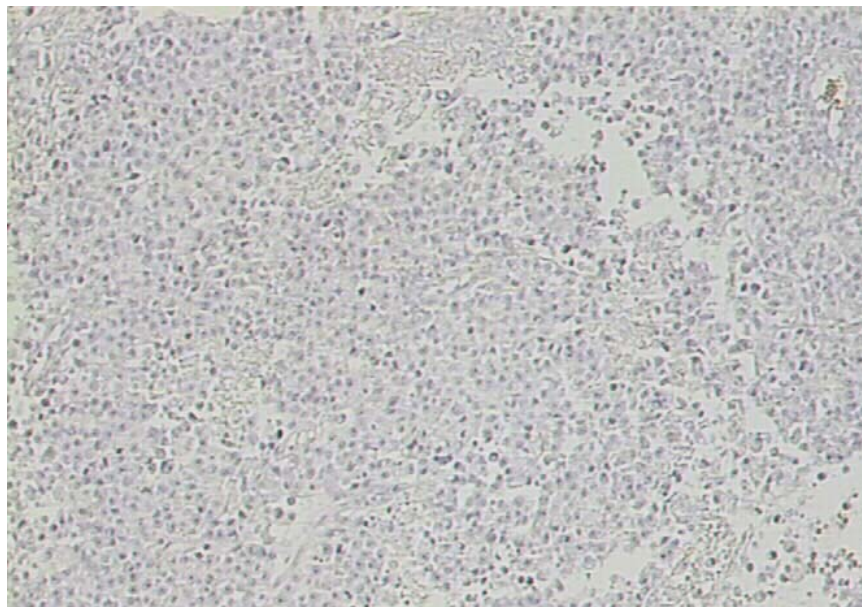


Abbildung 3.23

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.22 (122025). Mikroskopie 10x.

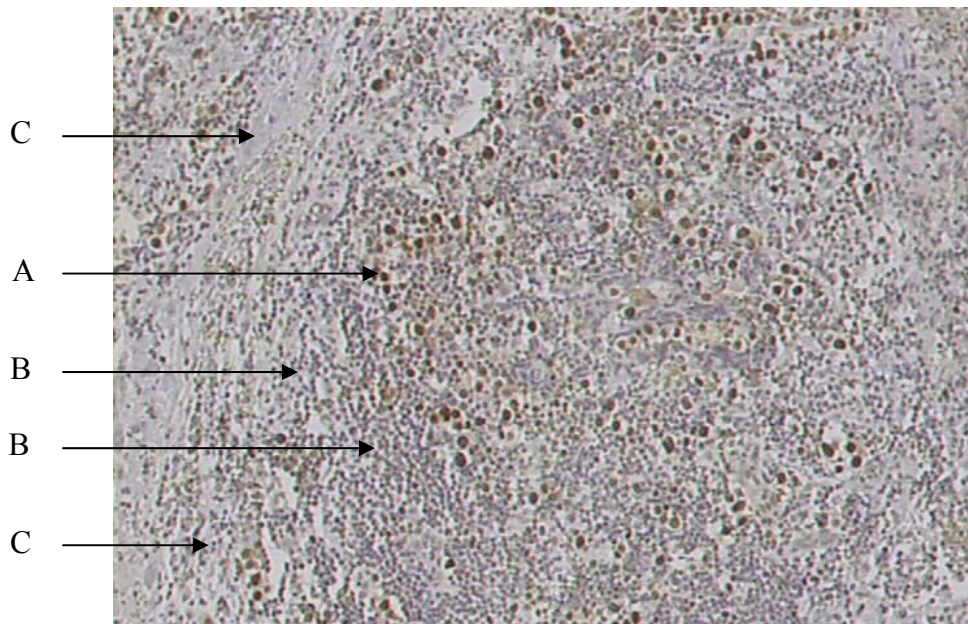


Abbildung 3.24

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines klassischen Seminoms (309038). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.25

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.24 (309038). Mikroskopie 10x.

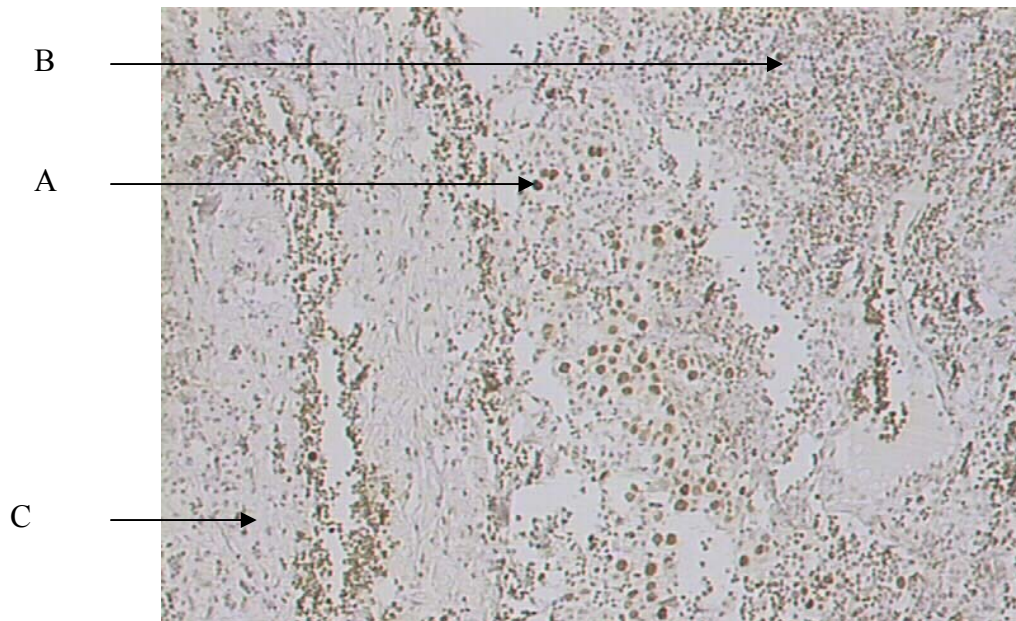


Abbildung 3.26

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines klassischen Seminoms (309038). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.27

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.26 (309038). Mikroskopie 10x.

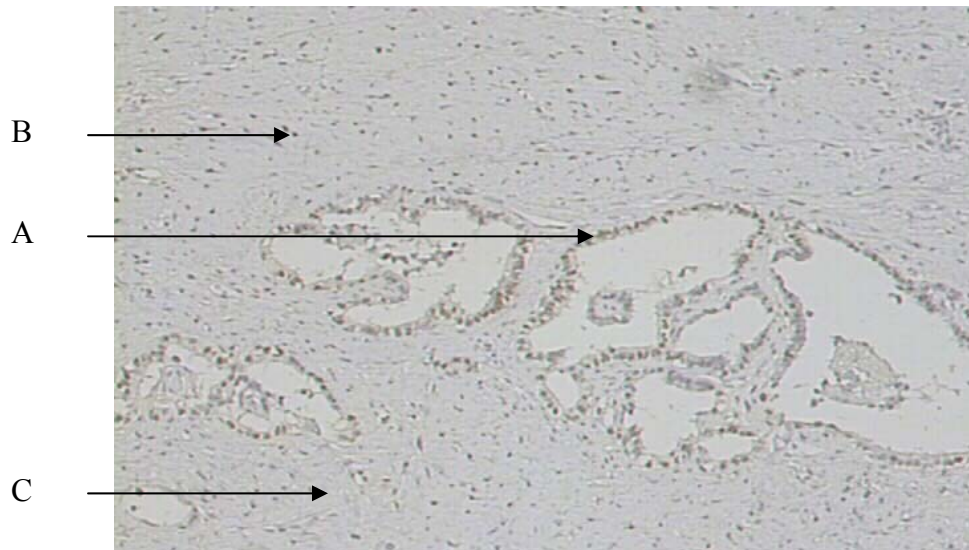


Abbildung 3.28

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (256121). A: Tumorzellen, schwache Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.29

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.28 (256121). Mikroskopie 10x.

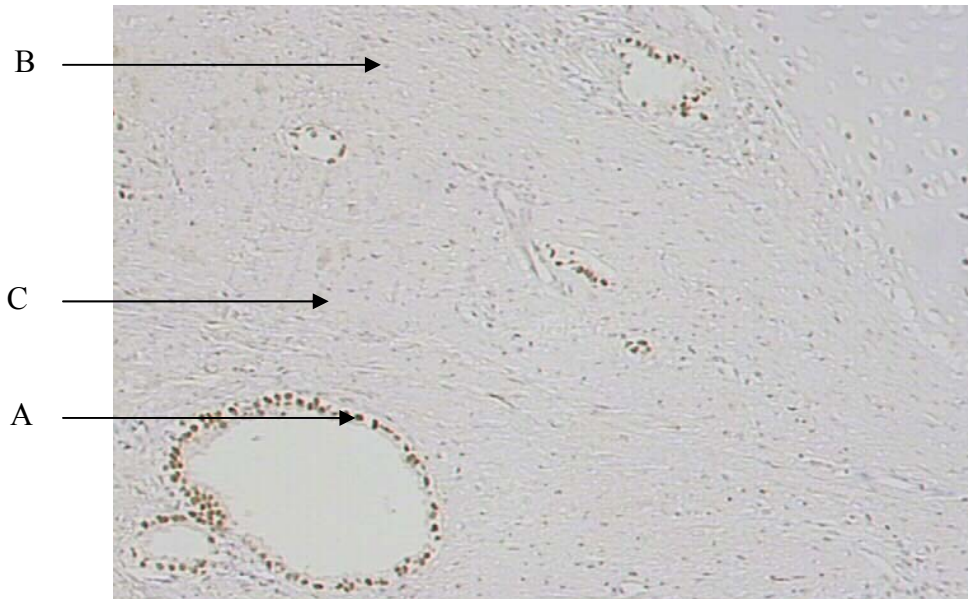


Abbildung 3.30

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (256121).

A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Im der oberen rechten Ecke sieht man Knorpelgewebe. Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.31

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.30 (256121). Mikroskopie 10x.

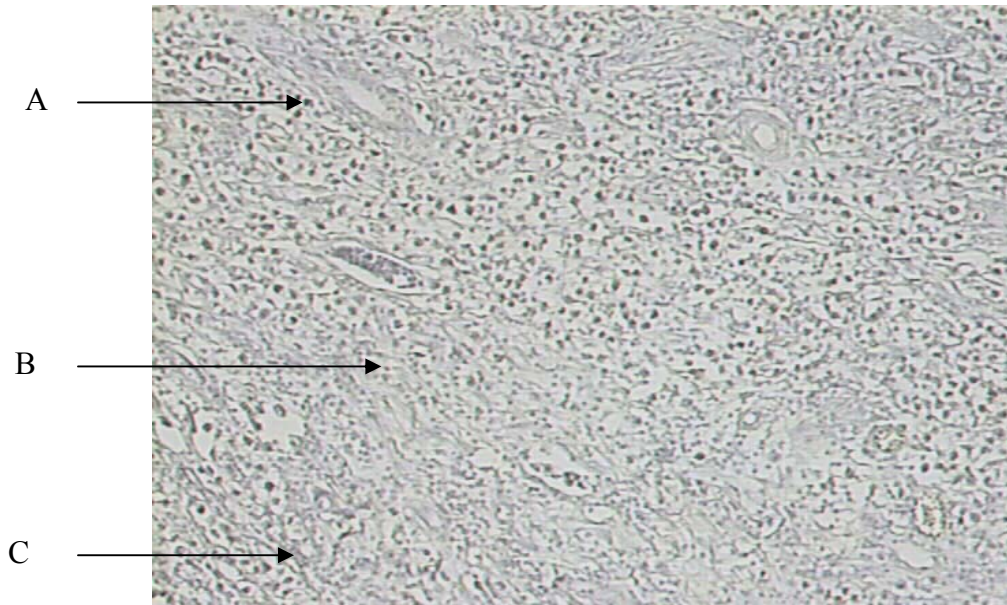


Abbildung 3.32

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (178442). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

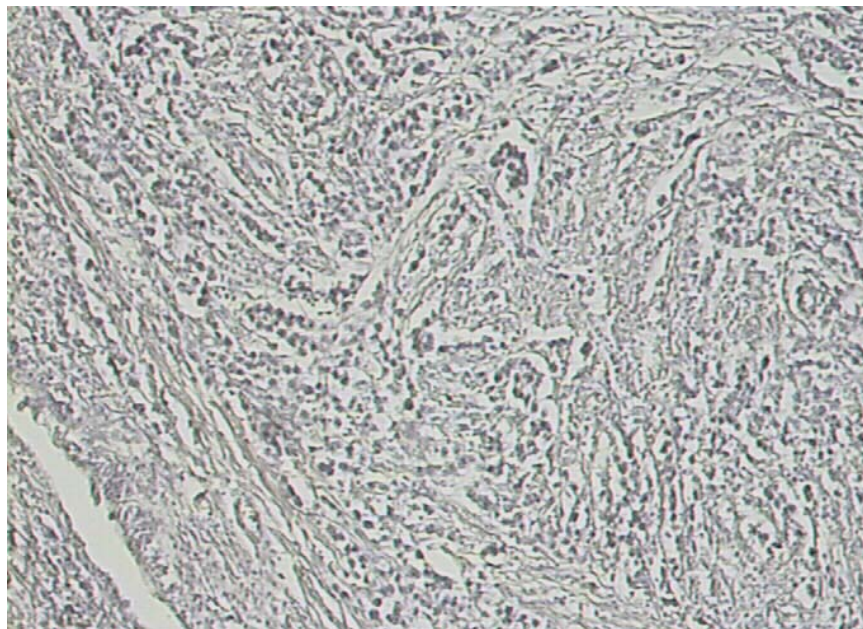


Abbildung 3.33

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in in Abbildung 3.32 (178442). Mikroskopie 10x.

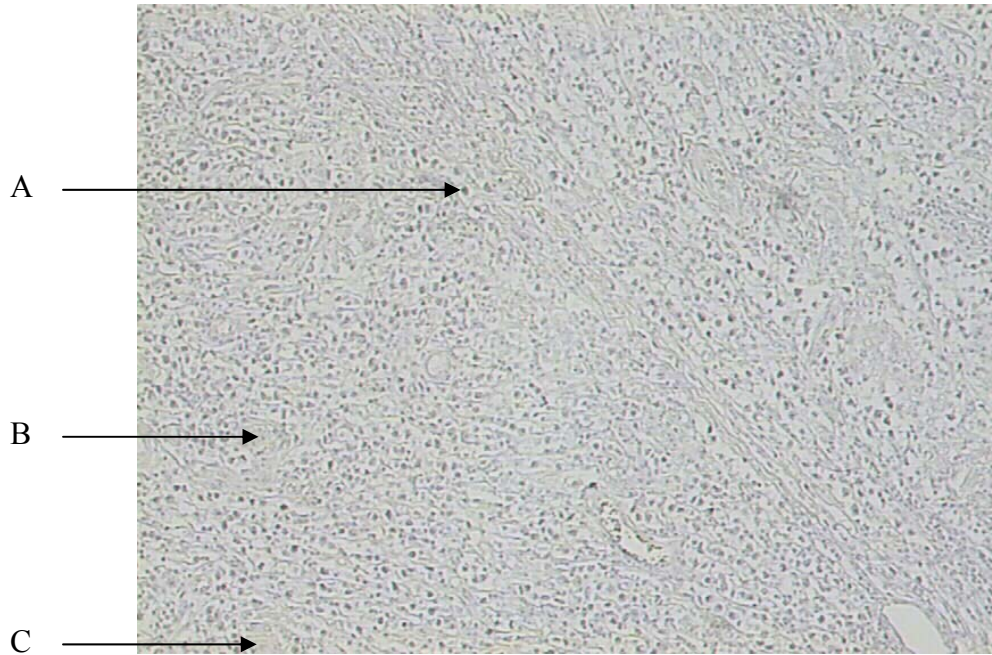


Abbildung 3.34

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (178442). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Mikroskopie 10x.

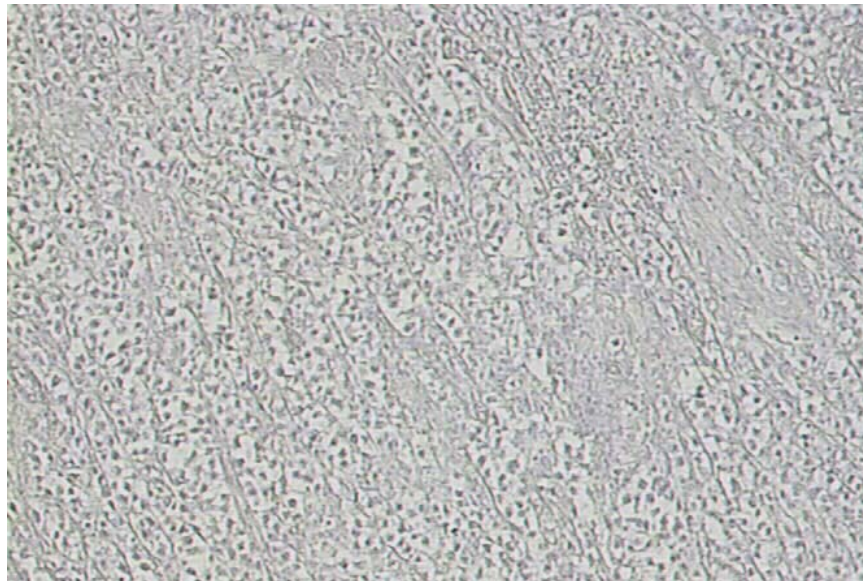


Abbildung 3.35

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in in Abbildung 3.34 (178442). Mikroskopie 10x.

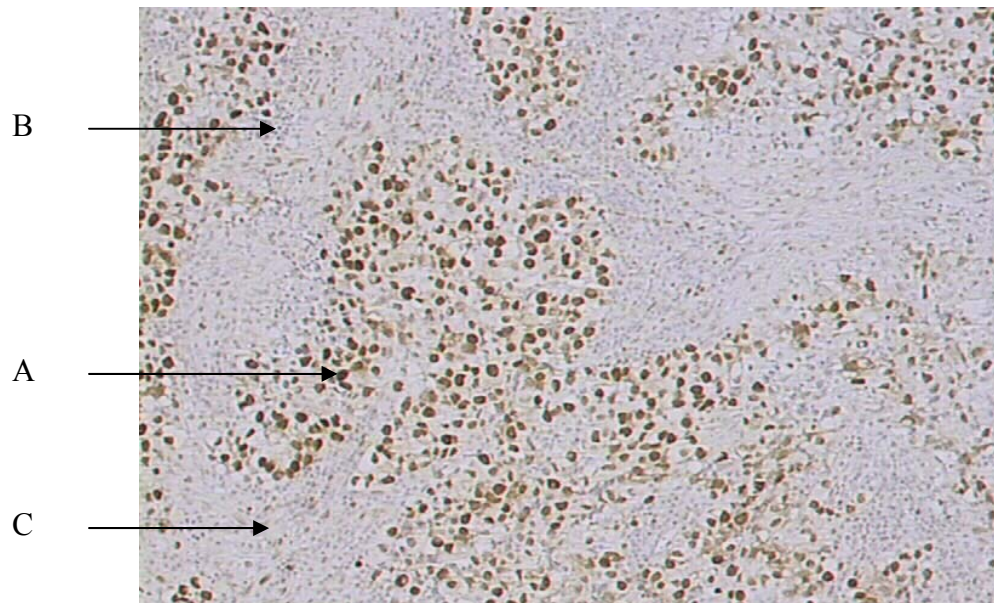


Abbildung 3.36

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem klassischen Seminom (211457). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.37

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.36 (211457). Mikroskopie 10x.

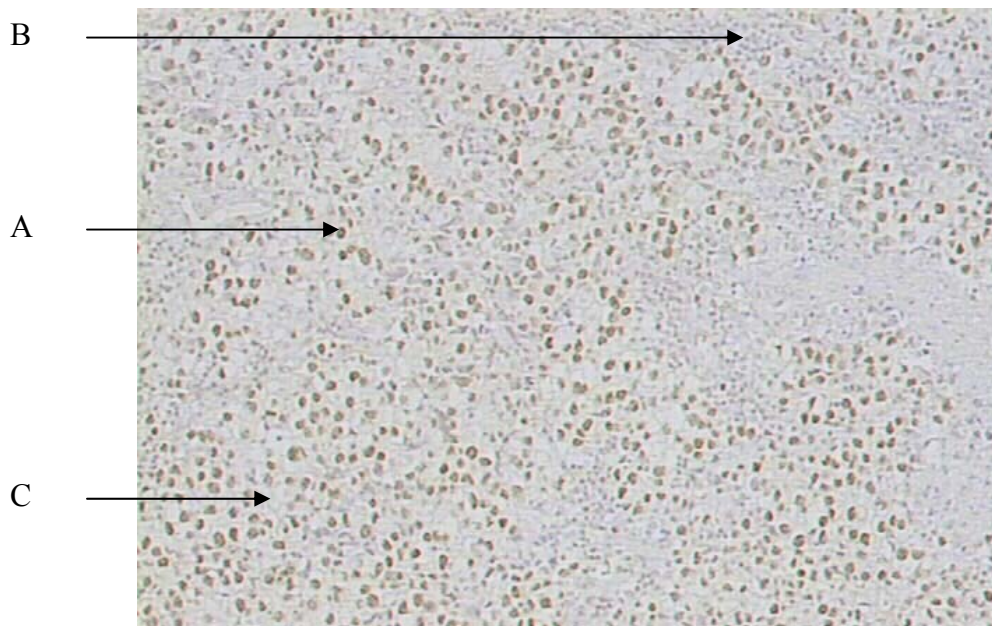


Abbildung 3.38

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem klassischen Seminom (211457). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

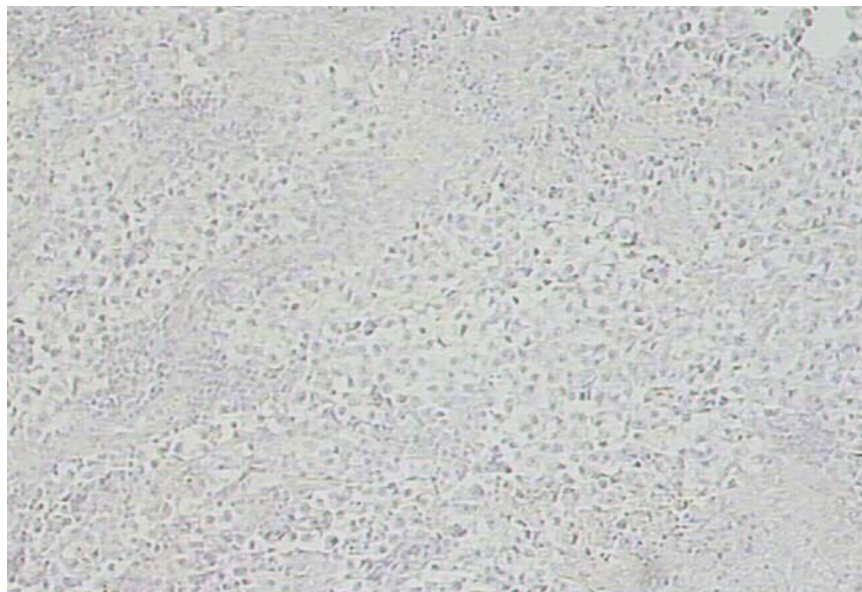


Abbildung 3.39

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten klassischen Seminoms in Abbildung 3.38 (211457). Mikroskopie 10x.

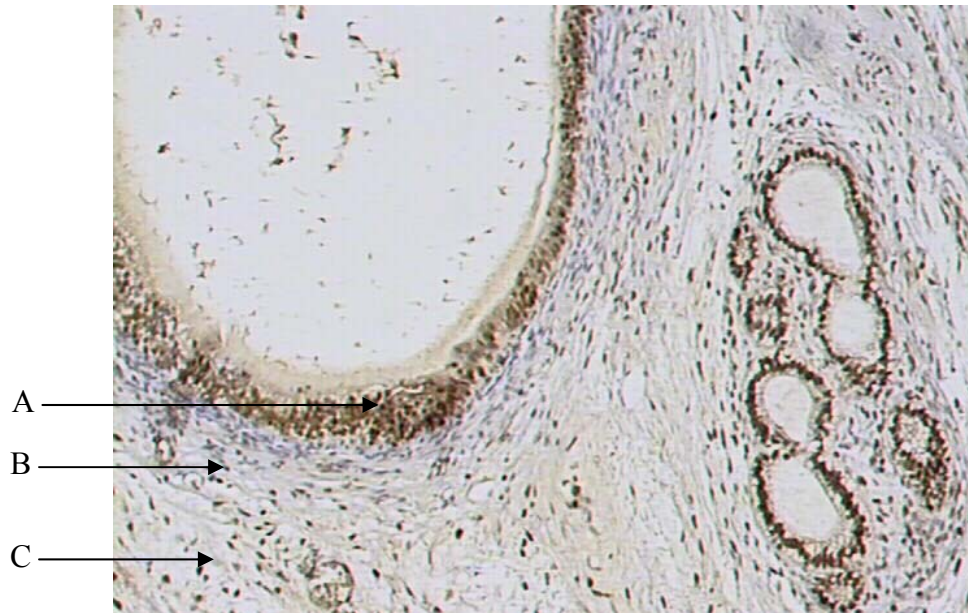


Abbildung 3.40

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase mit der Histologie eines reifen Teratoms (218868). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

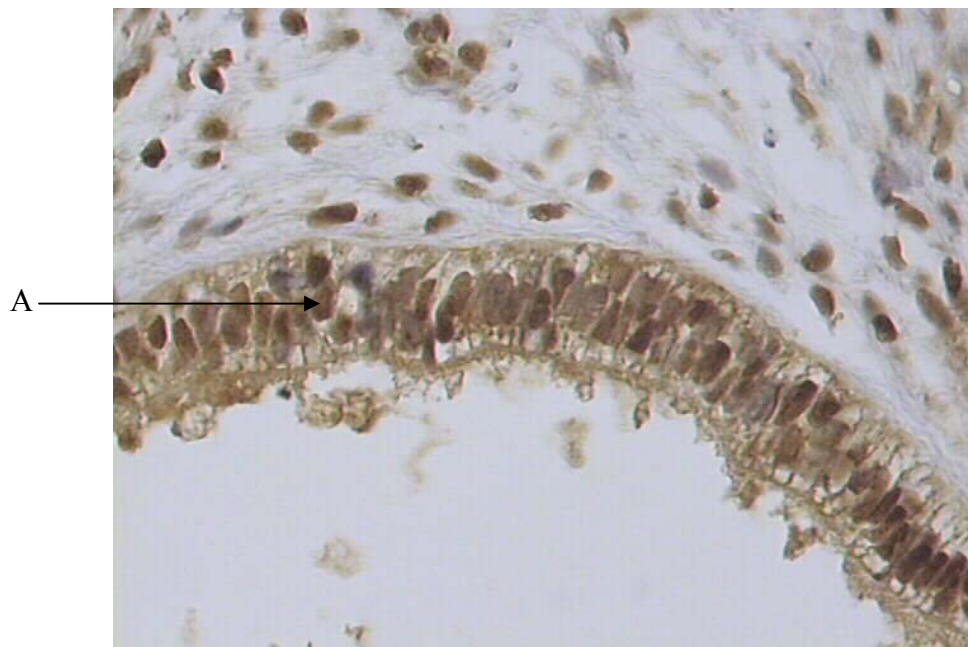


Abbildung 3.41

40 fache Vergrößerung des reifen Teratoms von Abbildung 3.40. A: Eine deutliche Kernanfärbung in den Tumorzellen ist zu erkennen.

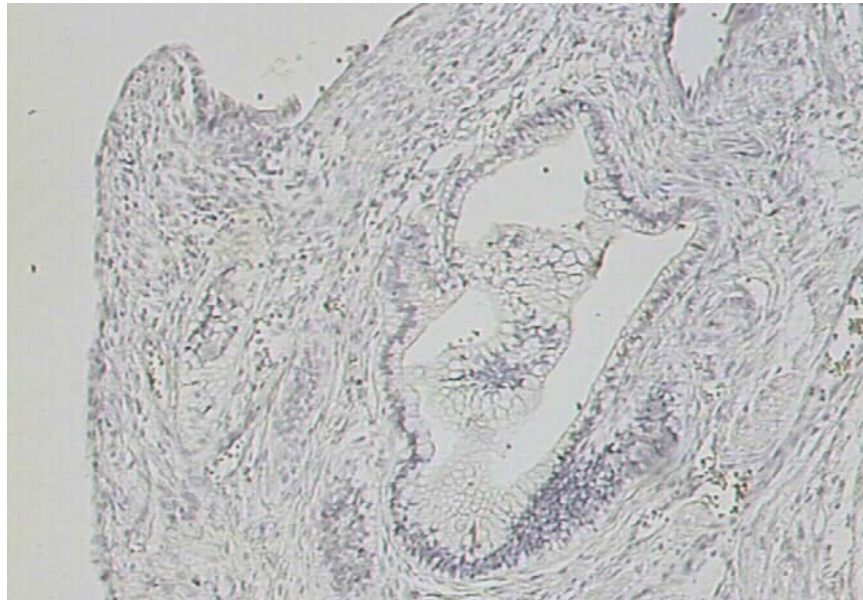


Abbildung 3.42

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase mit der Histologie eines reifen Teratoms in Abbildung 3.40 (218868). Mikroskopie 10x.

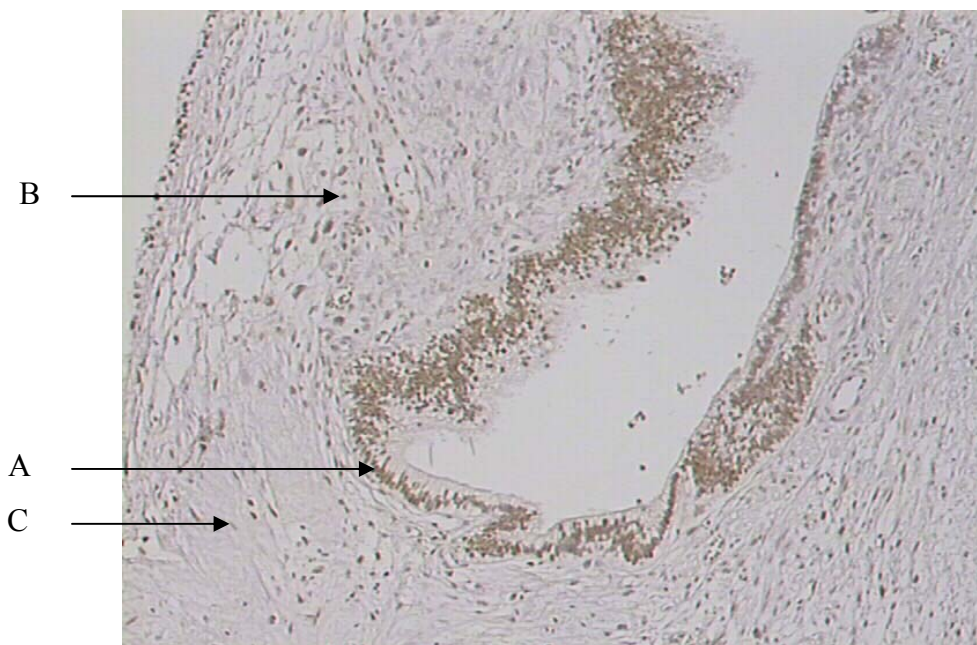


Abbildung 3.43

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase mit der Histologie eines reifen Teratoms (218868). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

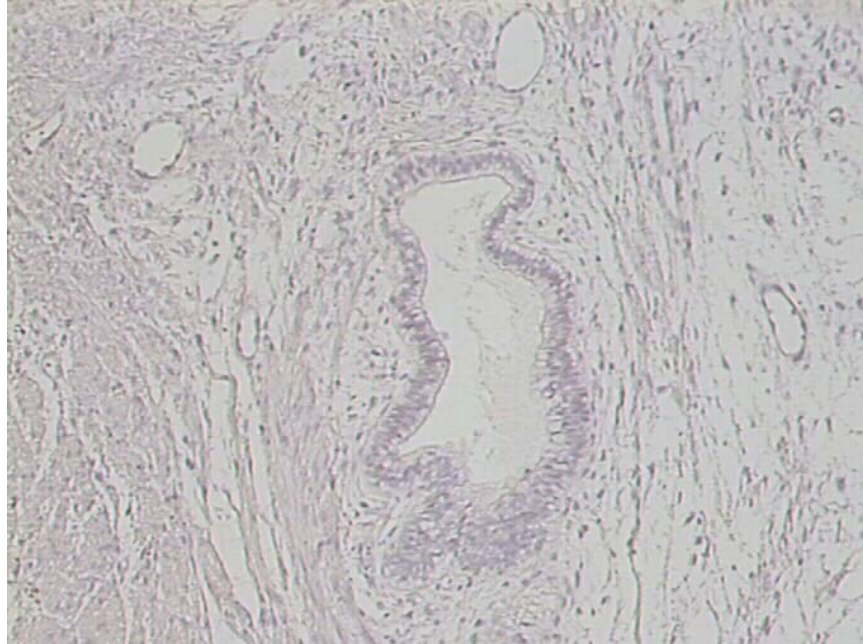


Abbildung 3.44

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase mit der Histologie eines reifen Teratoms in Abbildung 3.43 (218868). Mikroskopie 10x.

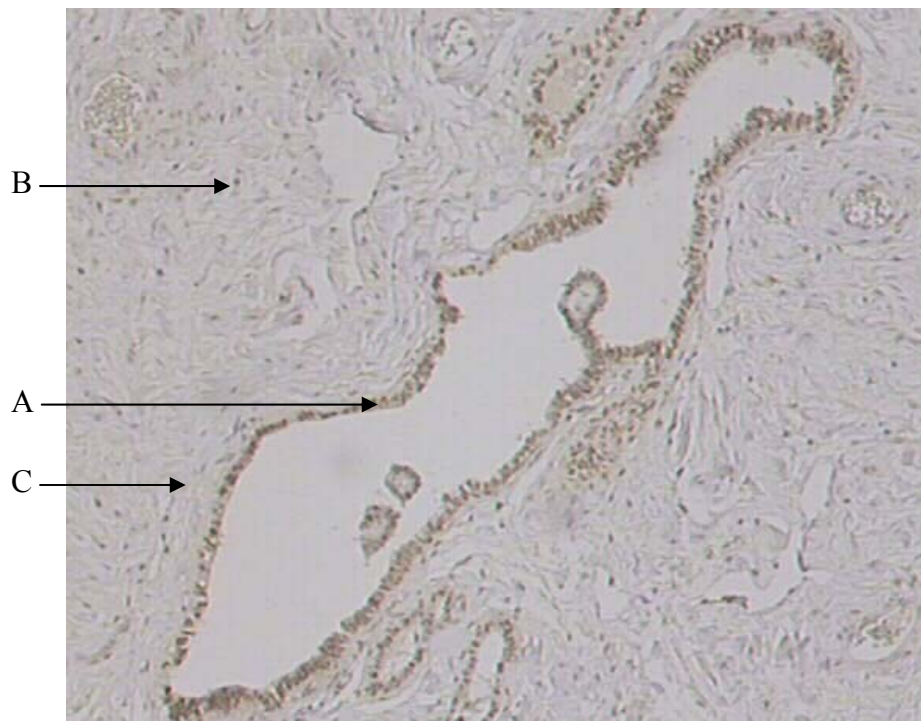


Abbildung 3.45

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem reifen Teratom (213457). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

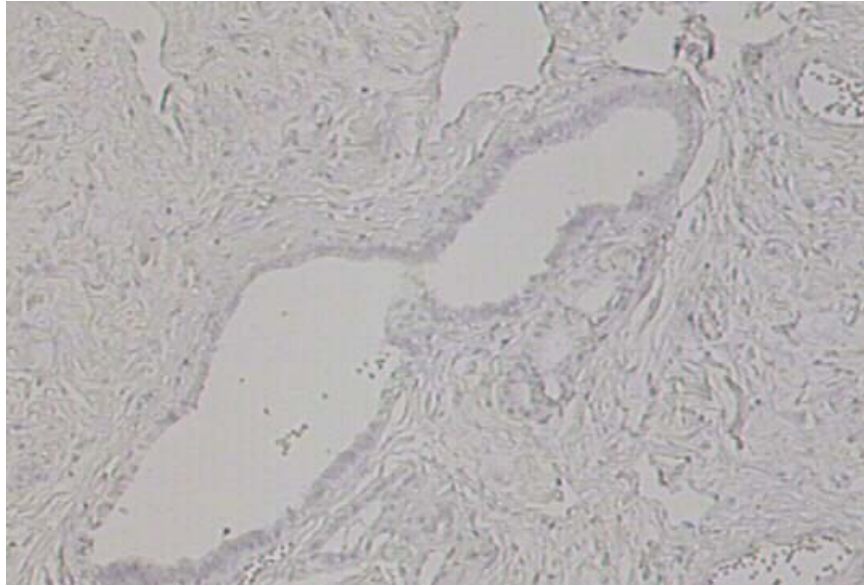


Abbildung 3.46

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten reifen Teratoms in Abbildung 3.45 (213457). Mikroskopie 10x.

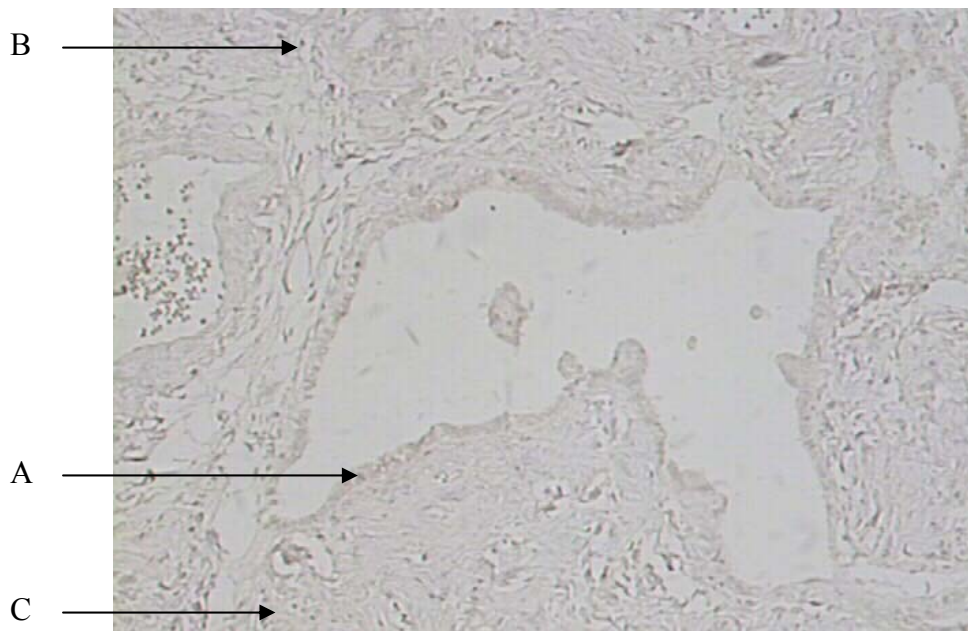


Abbildung 3.47

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem reifen Teratom (213457). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

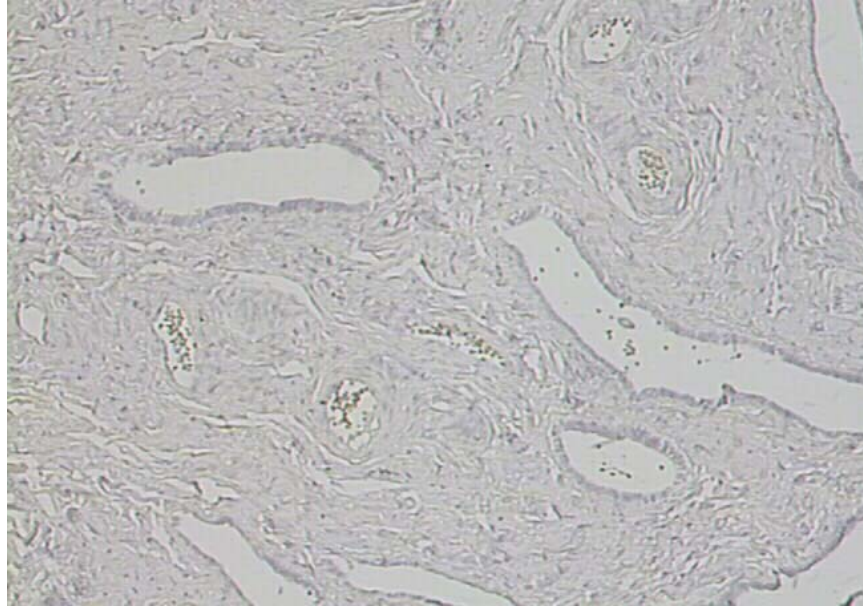


Abbildung 3.48

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten reifen Teratoms in Abbildung 3.47 (213457). Mikroskopie 10x.

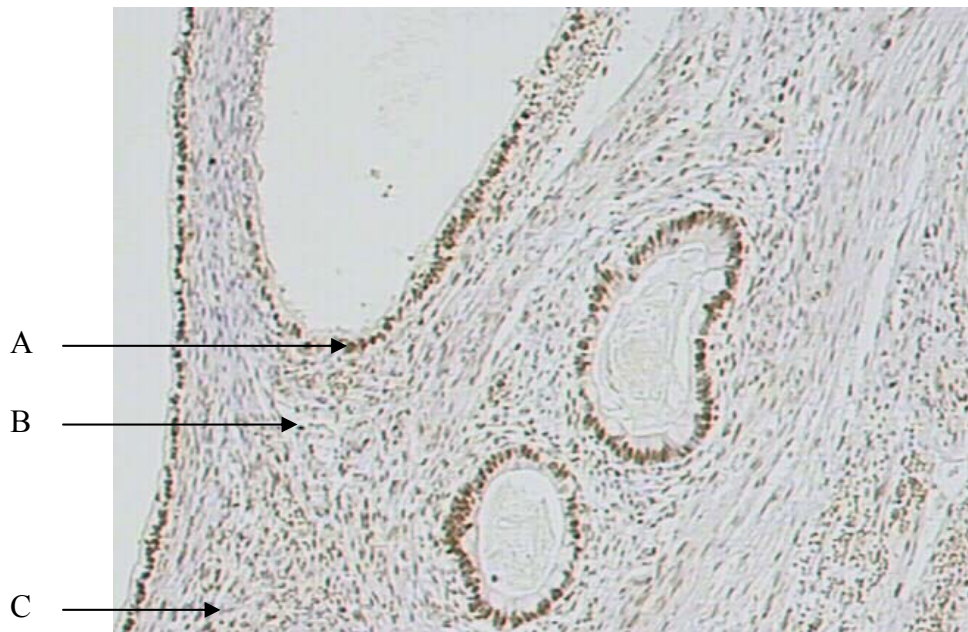


Abbildung 3.49

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem reifen Teratom (321984). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.50

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten reifen Teratoms in Abbildung 3.49 (321984). Mikroskopie 10x.

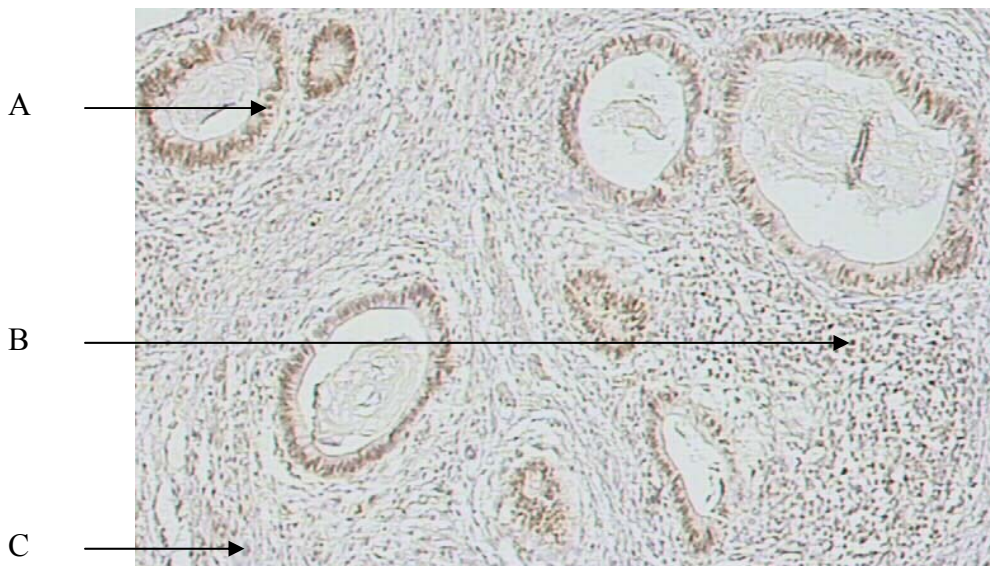


Abbildung 3.51

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem reifen Teratom (321984). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache bis stärkere Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

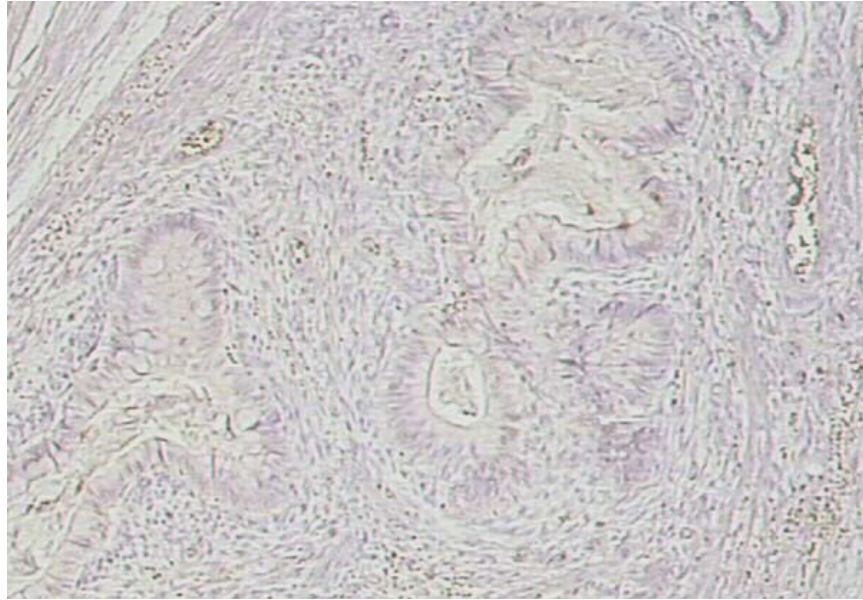


Abbildung 3.52

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten reifen Teratoms in Abbildung 3.51 (321984). Mikroskopie 10x.

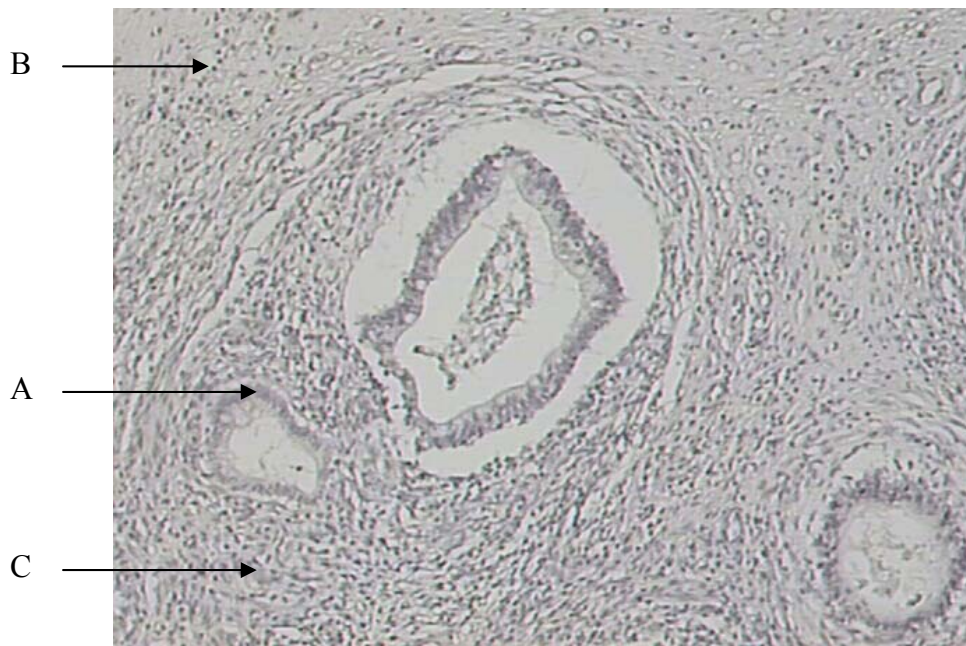


Abbildung 3.53

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem reifen, unreifen Teratom (309140). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

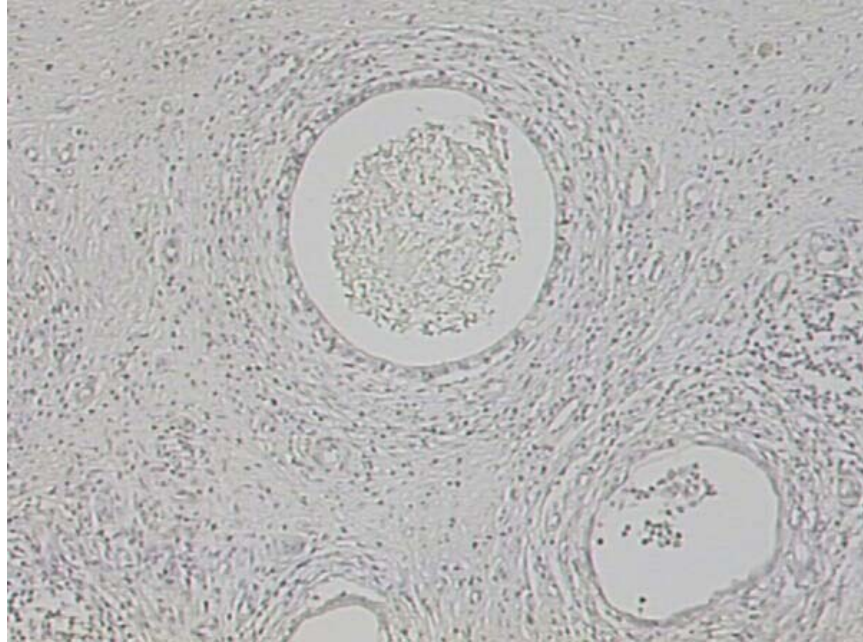


Abbildung 3.54

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten reifen, unreifen Teratoms in Abbildung 3.53 (309140). Mikroskopie 10x.

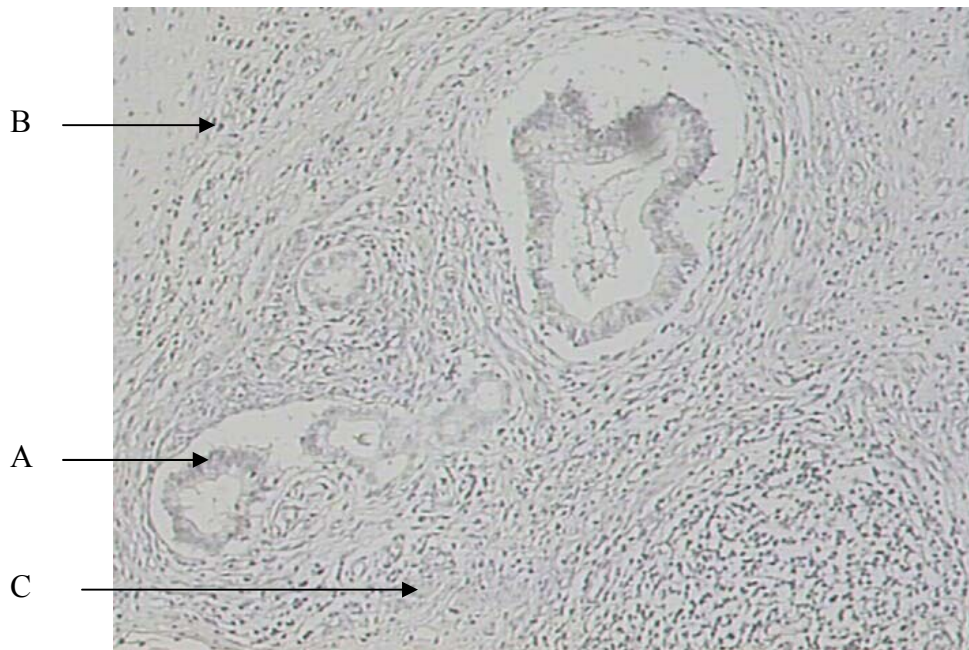


Abbildung 3.55

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem reifen, unreifen Teratom (309140). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

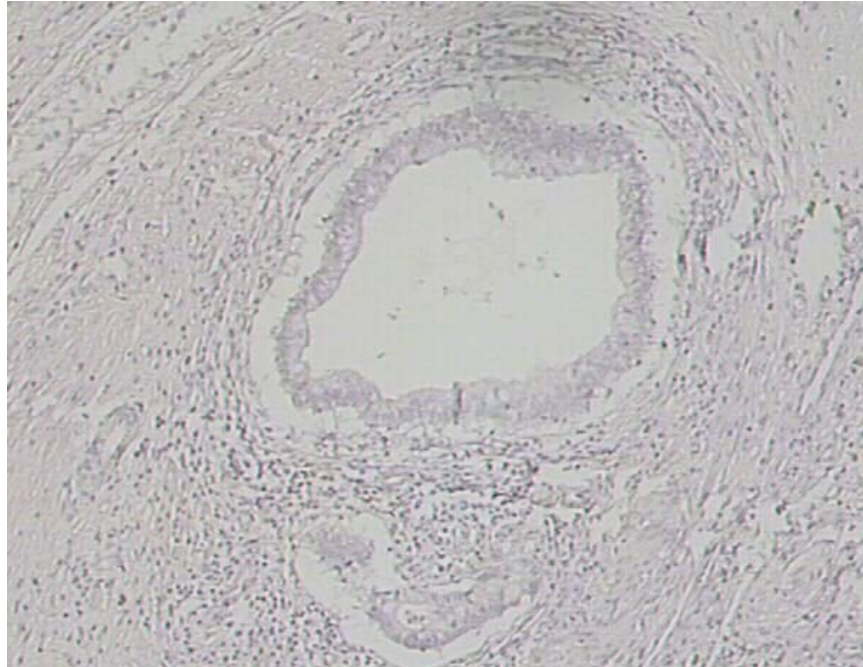


Abbildung 3.56

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten reifen, unreifen Teratoms in Abbildung 3.55 (309140). Mikroskopie 10x.

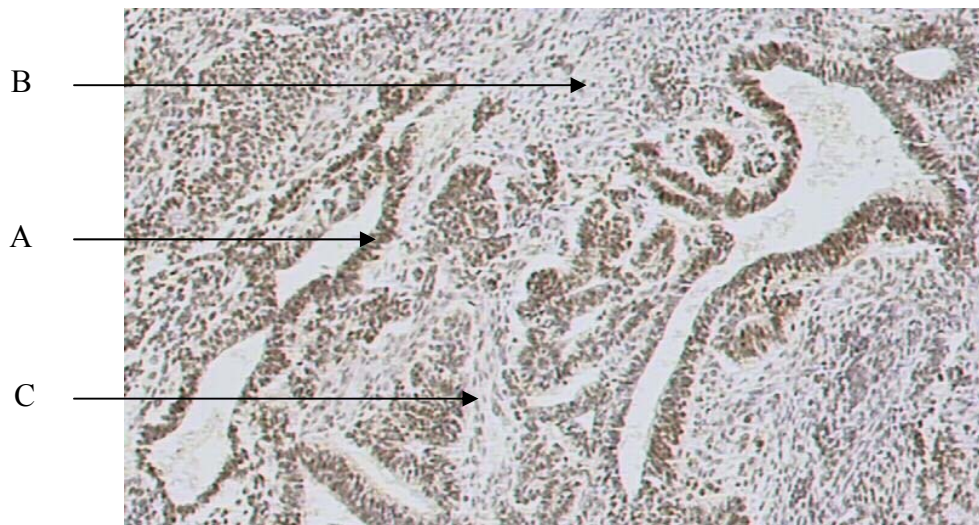


Abbildung 3.57

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Misch tumor (reifes Teratom und Yolk-Sac) (496961).

A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

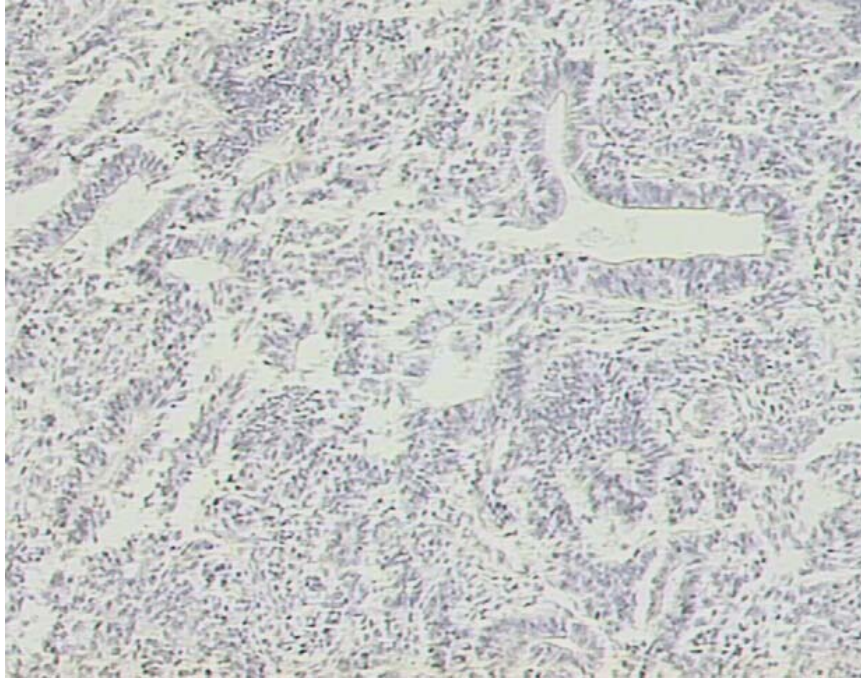


Abbildung 3.58

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Mischtumors in Abbildung 3.57 (496961). Mikroskopie 10x.

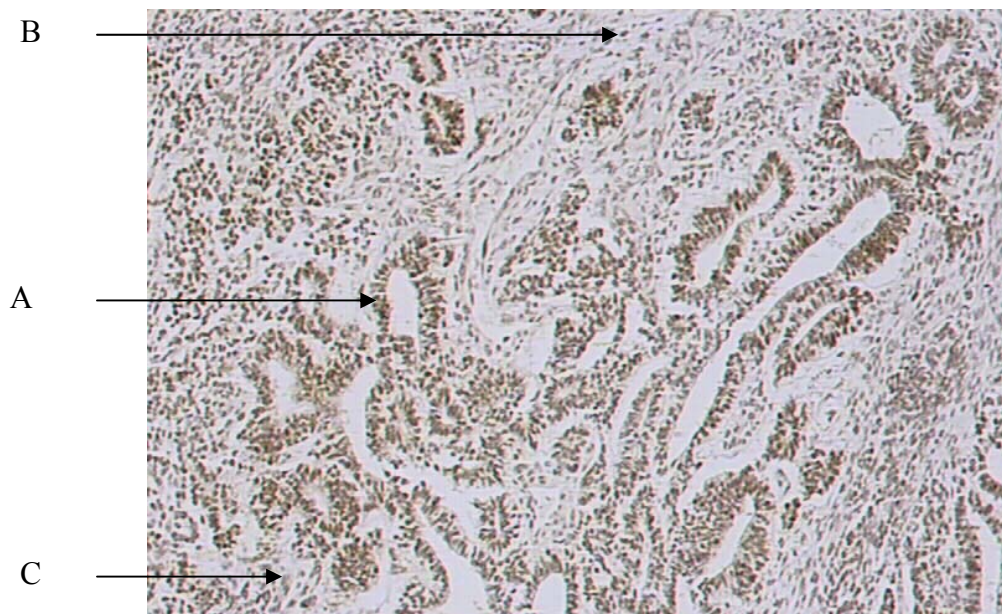


Abbildung 3.59

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Mischtumor (reifes Teratom und Yolk-Sac) (496961). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

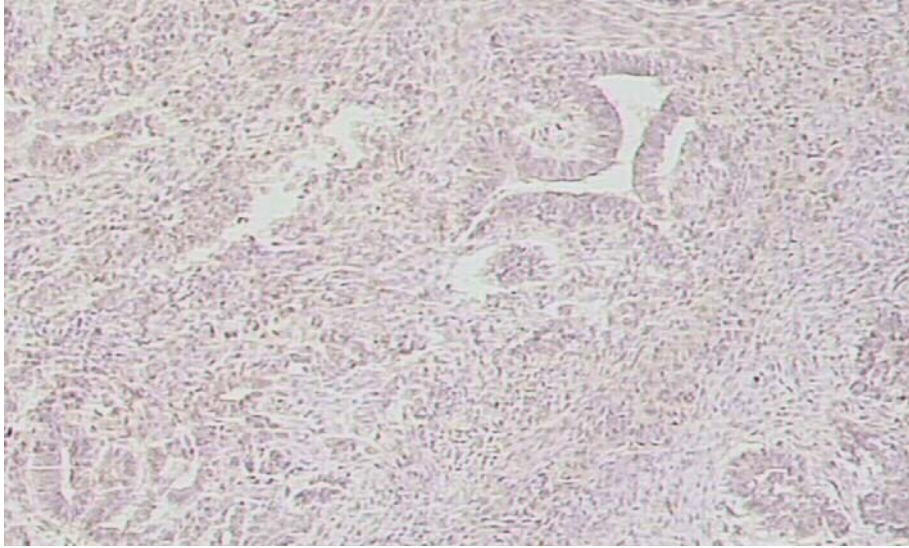


Abbildung 3.60

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Mischtumors in Abbildung 3.59 (496961). Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.61

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Teratom (329919). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

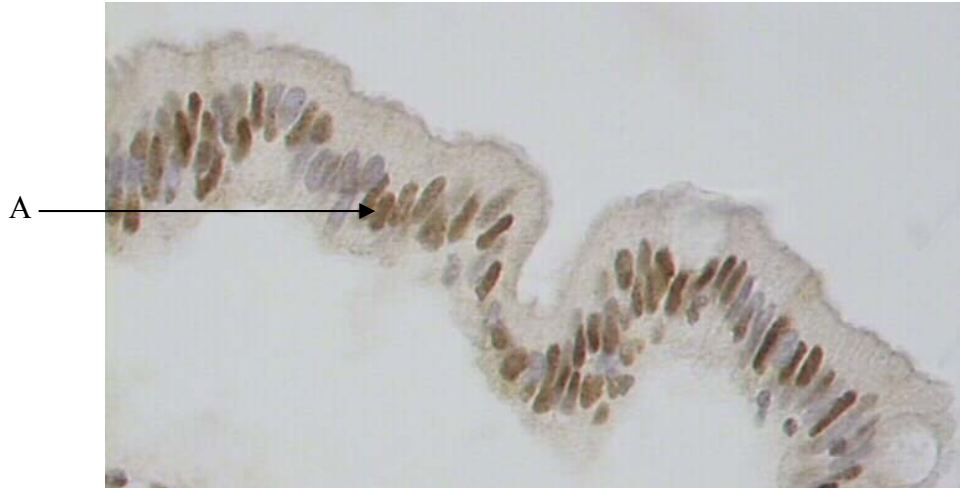


Abbildung 3.62

40 fache Vergrößerung des reifen Teratoms von Abbildung 3.61. A: In einigen Tumorzellen ist eine deutliche Kernfärbung zu erkennen (braun), in anderen nicht (blau).

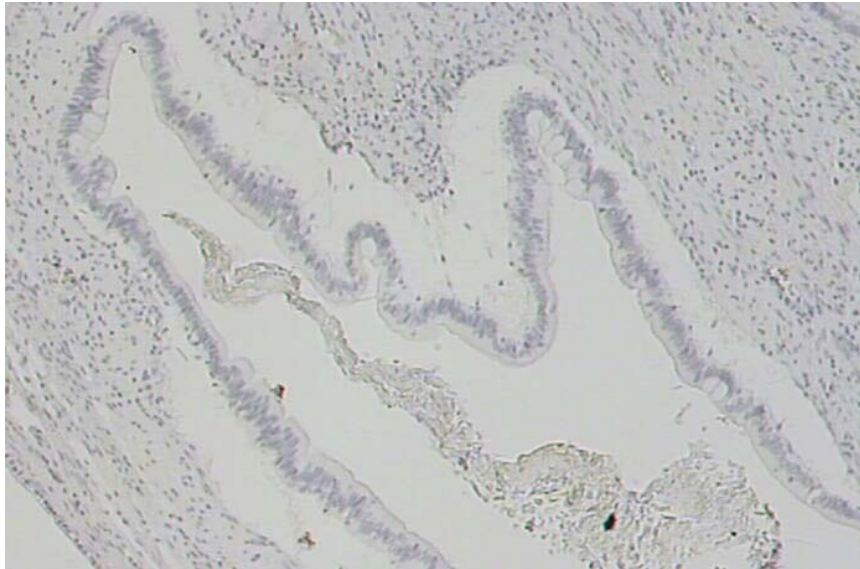


Abbildung 3.63

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Teratoms in Abbildung 3.61 (329919). Mikroskopie 10x.

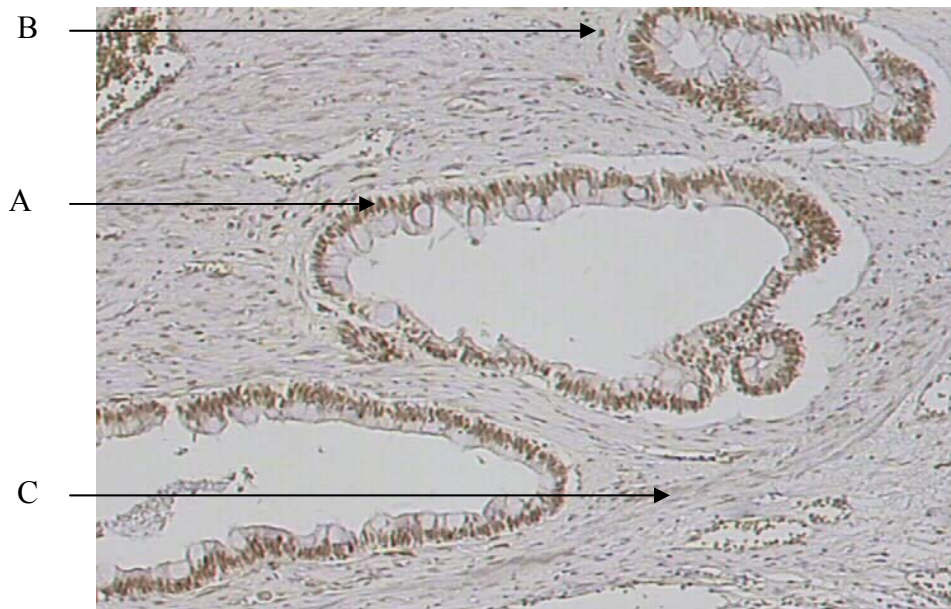


Abbildung 3.64

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Teratom (329919). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

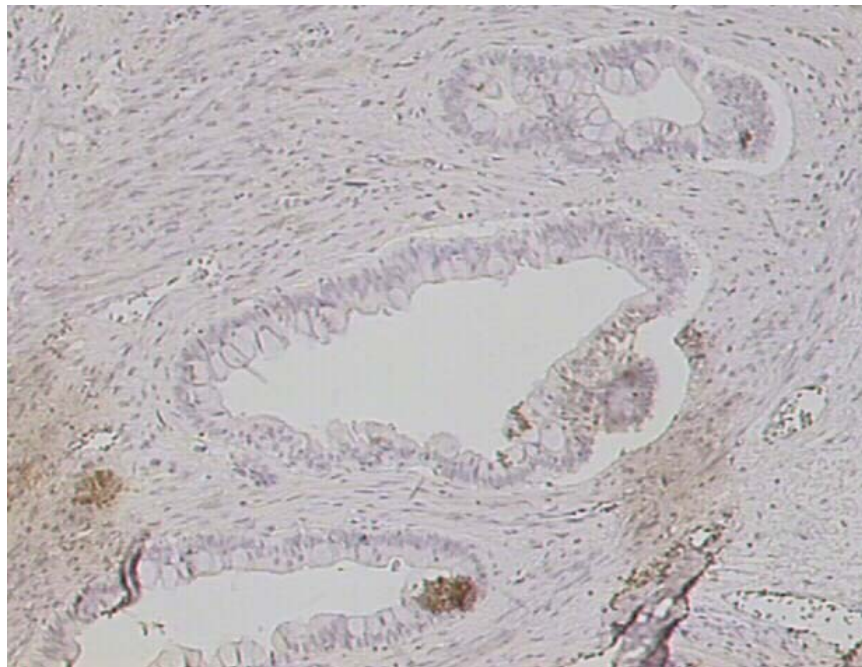


Abbildung 3.65

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Teratoms in Abbildung 3.64 (329919). Mikroskopie 10x.

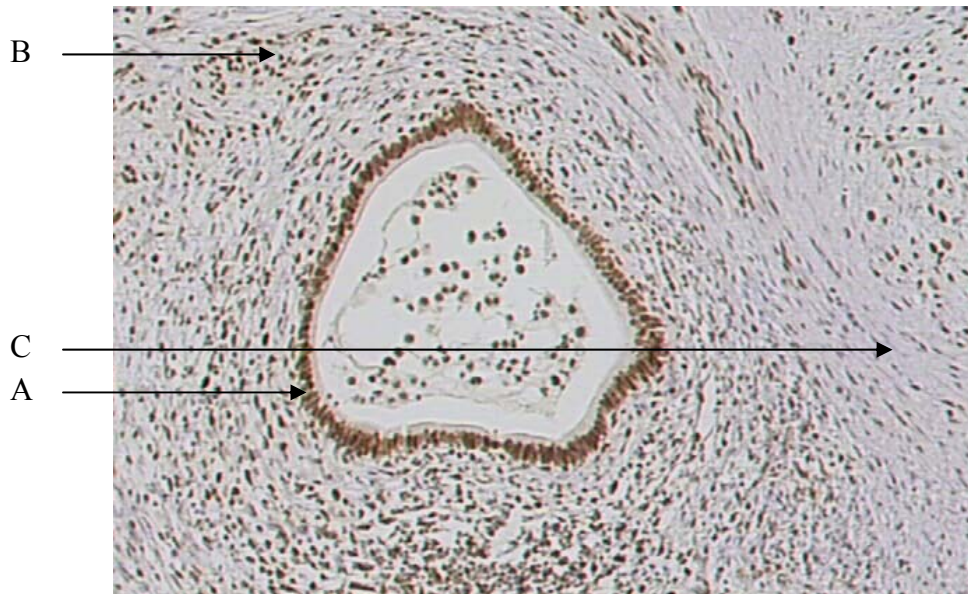


Abbildung 3.66

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Teratom (123967). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache bis starke Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.67

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Teratoms in Abbildung 3.66 (123967). Mikroskopie 10x.

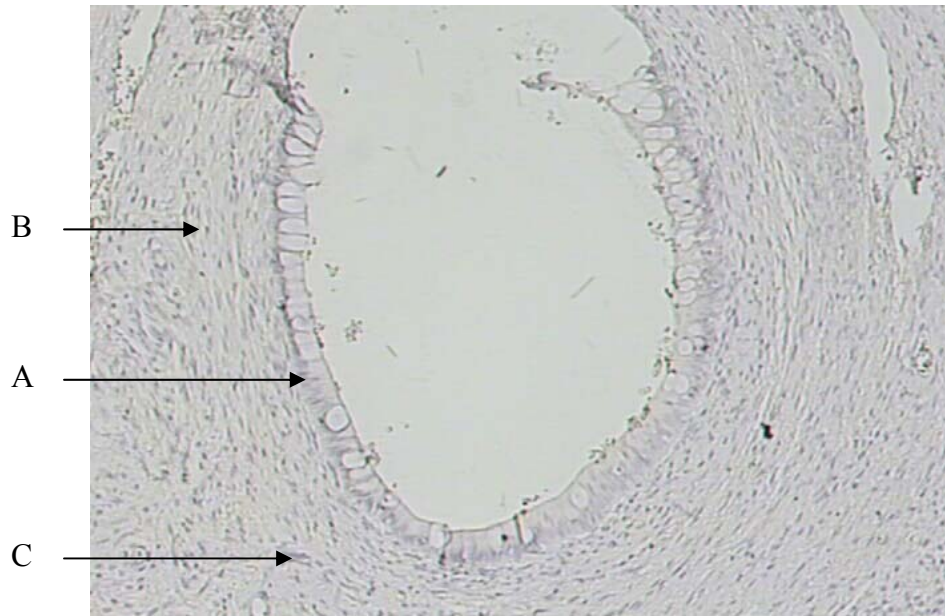


Abbildung 3.68

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Teratom (123967). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

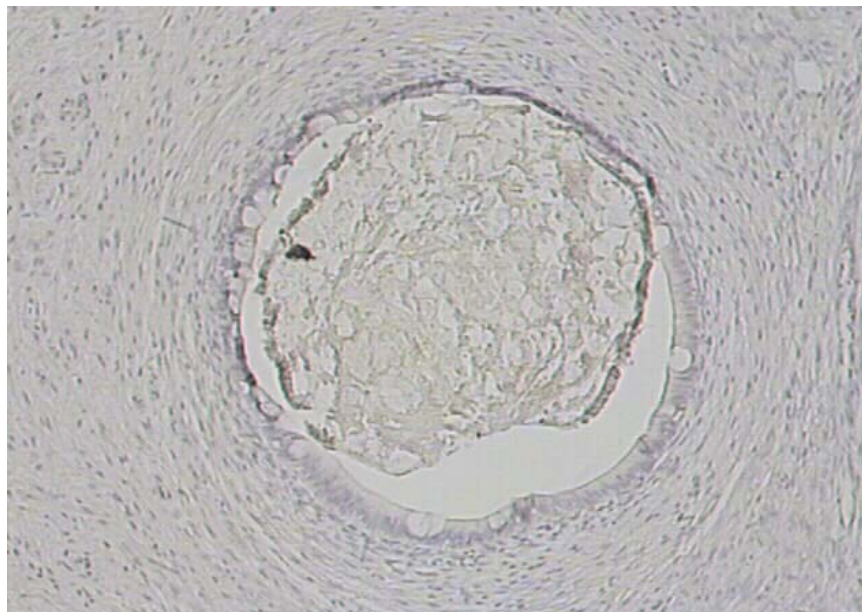


Abbildung 3.69

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Teratoms in Abbildung 3.68 (123967). Mikroskopie 10x.

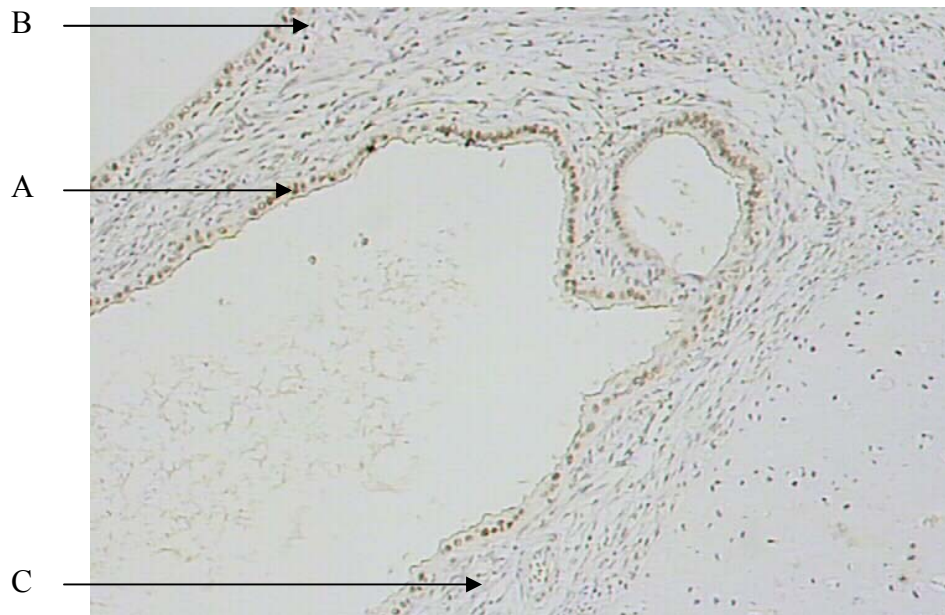


Abbildung 3.70

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (321984). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache bis starke Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Unten rechts im Bild sieht man Knorpelzellen. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

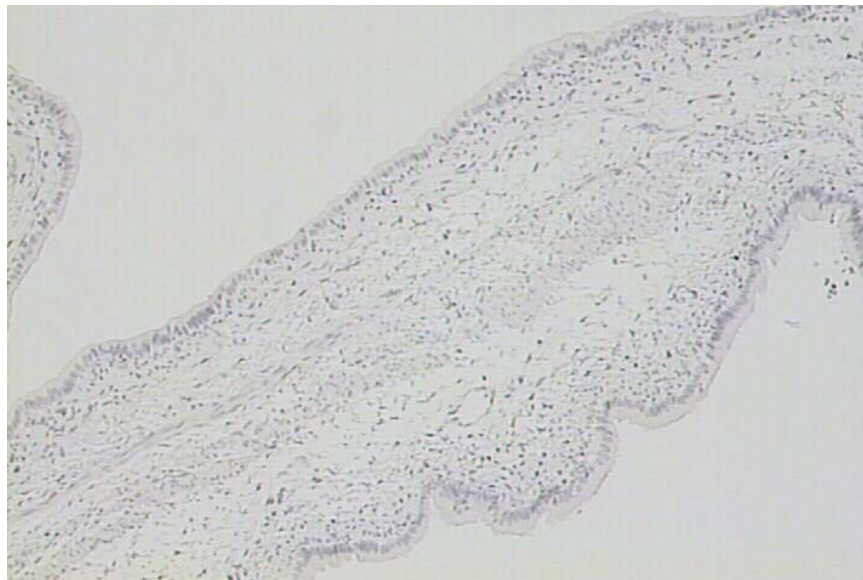


Abbildung 3.71

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.70 (321984). Mikroskopie 10x.

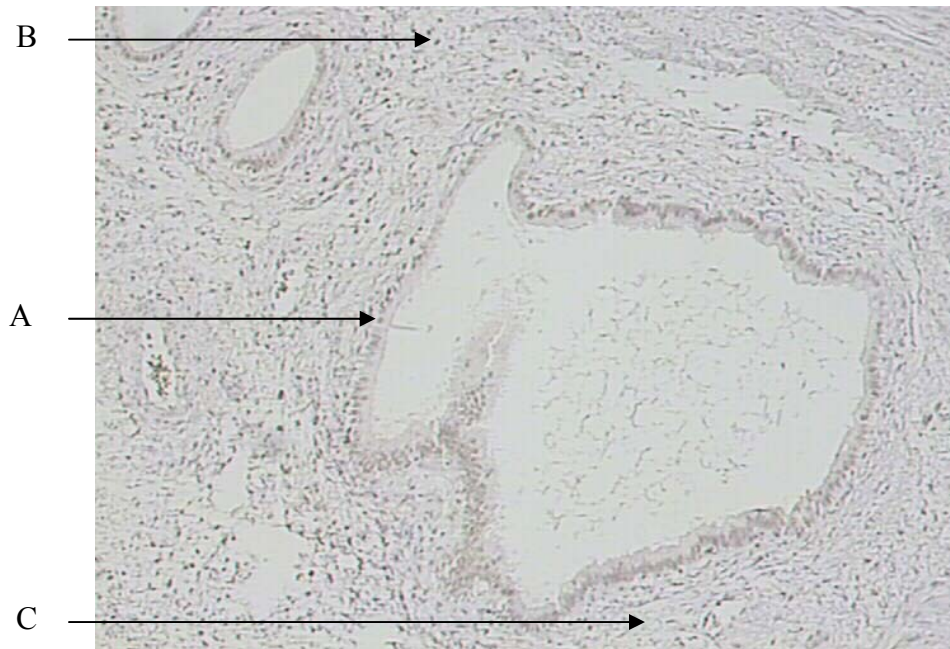


Abbildung 3.72

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (321984). A: Tumorzellen, schwache Anfärbung. B: Lymphozyten, schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

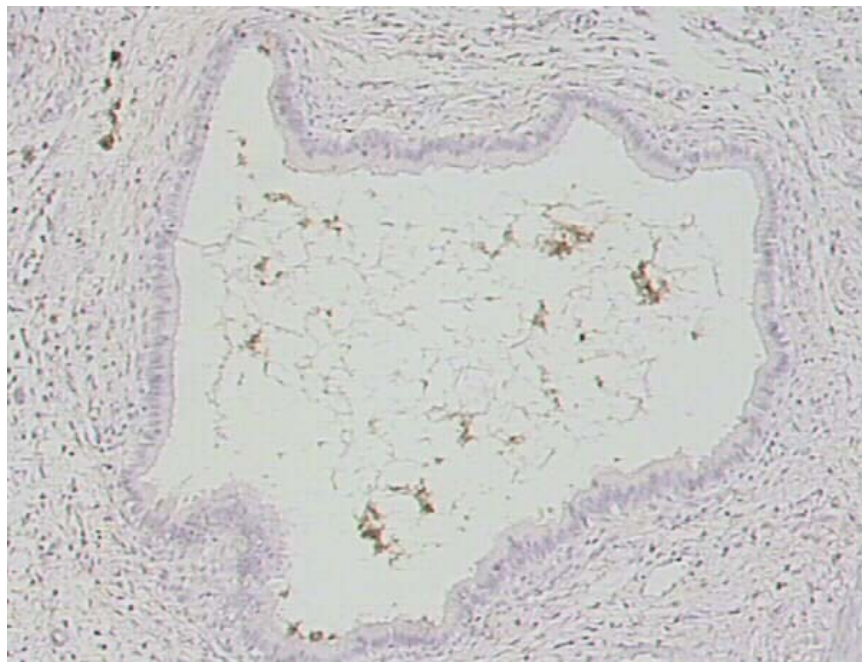


Abbildung 3.73

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.72 (321984). Mikroskopie 10x.

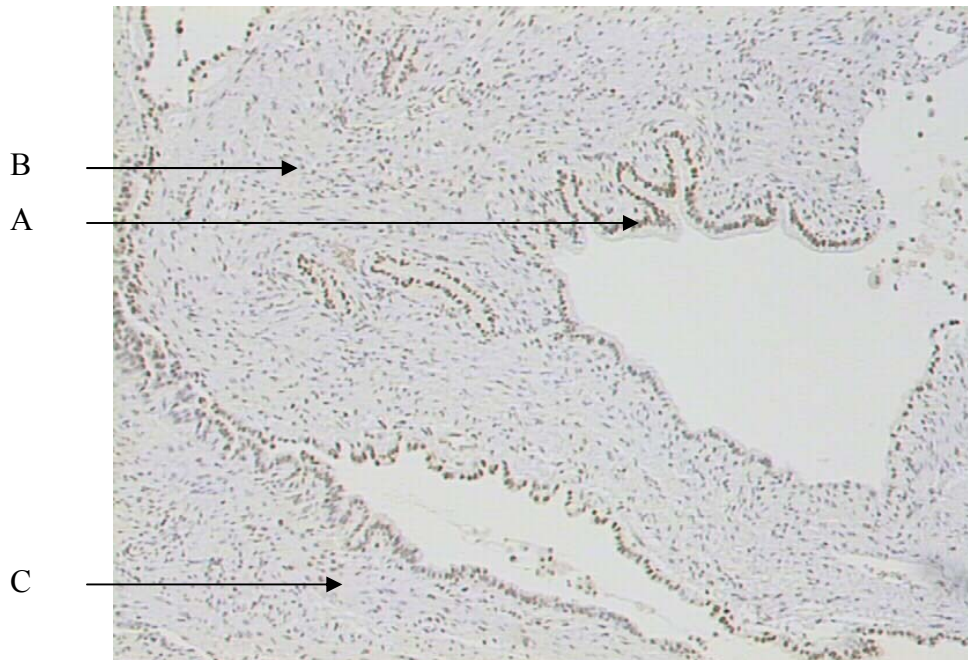


Abbildung 3.74

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (502203). A: Tumorzellen, schwache bis starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Unten rechts im Bild sieht man Knorpelzellen. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

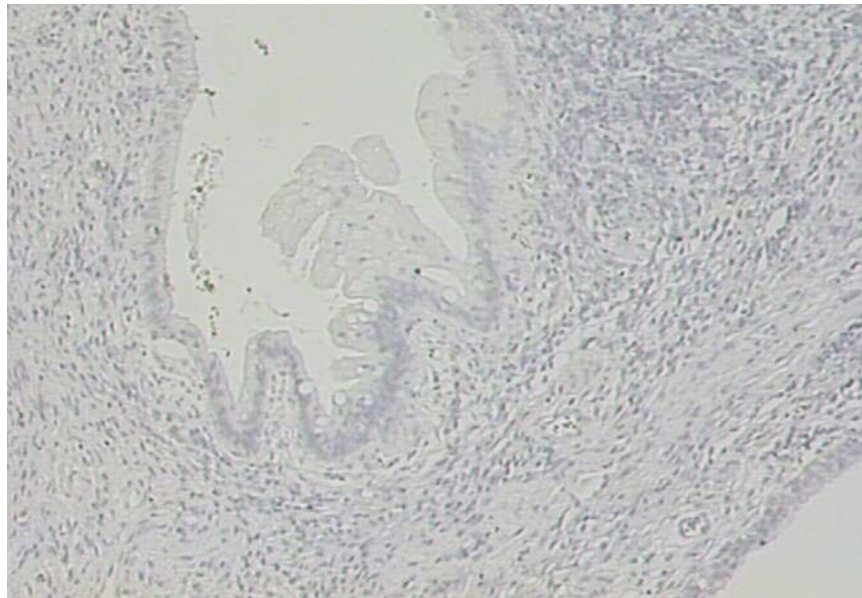


Abbildung 3.75

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.74 (502203). Mikroskopie 10x.

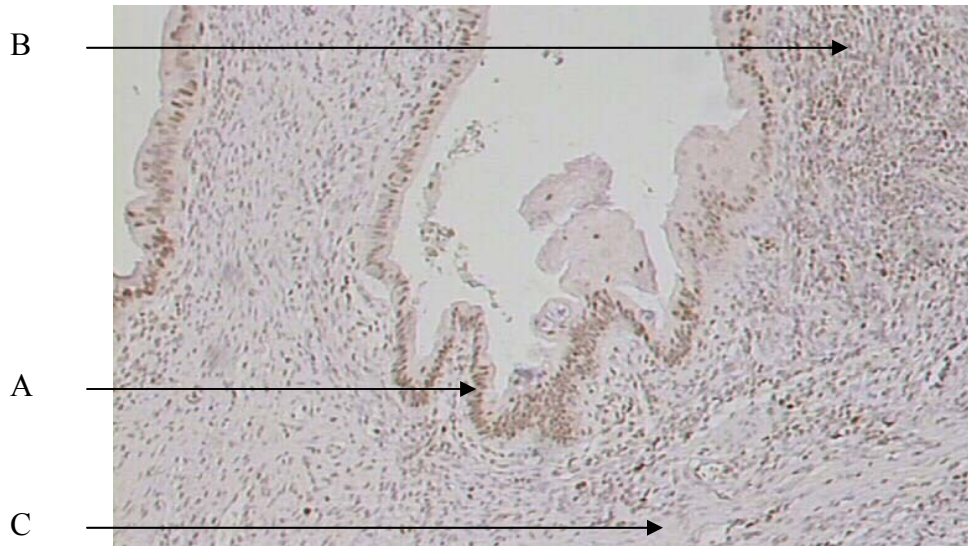


Abbildung 3.76

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (502203). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Unten rechts im Bild sieht man Knorpelzellen. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

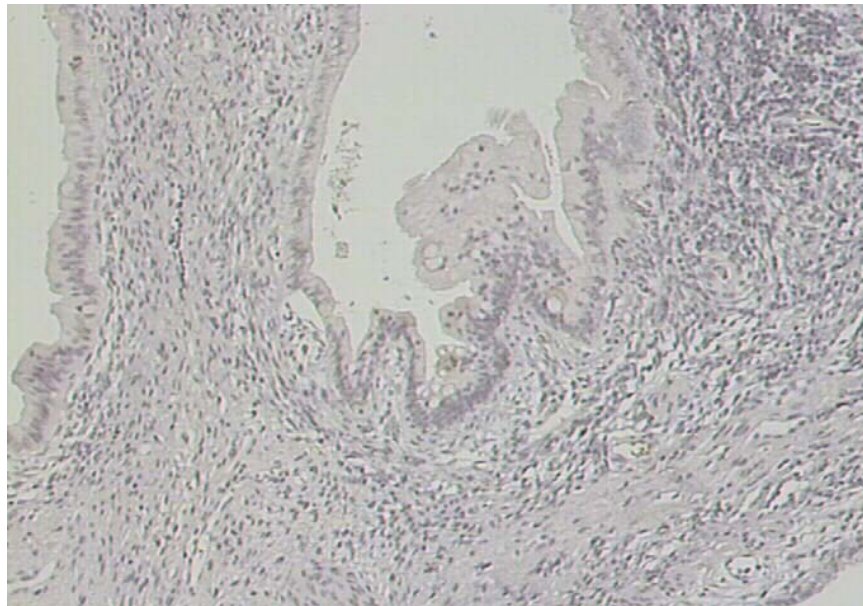


Abbildung 3.77

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.76 (502203). Mikroskopie 10x.

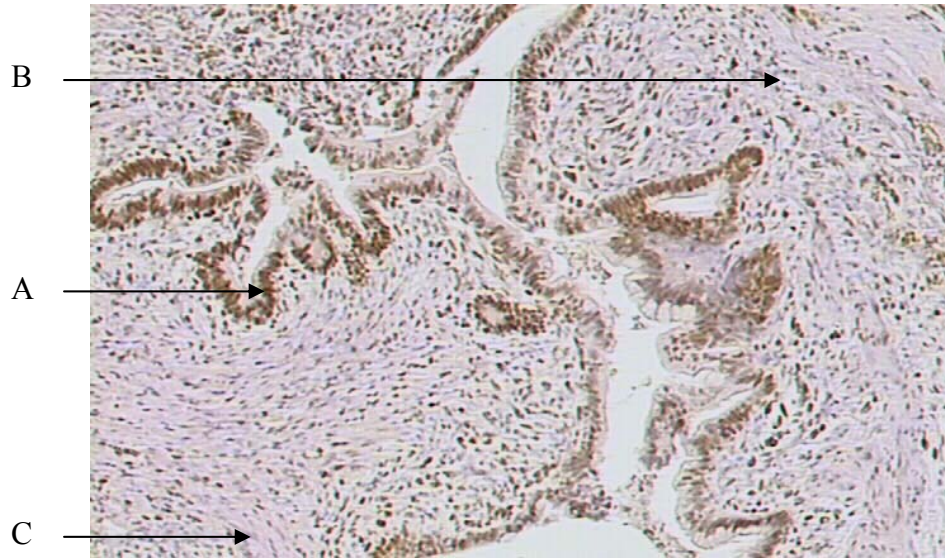


Abbildung 3.78

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (484204). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

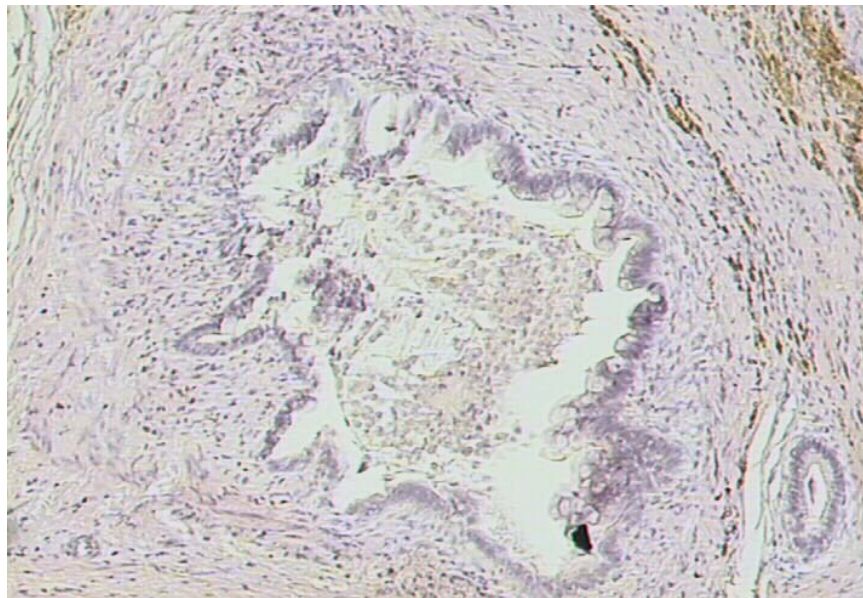


Abbildung 3.79

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.78 (484204). Mikroskopie 10x.

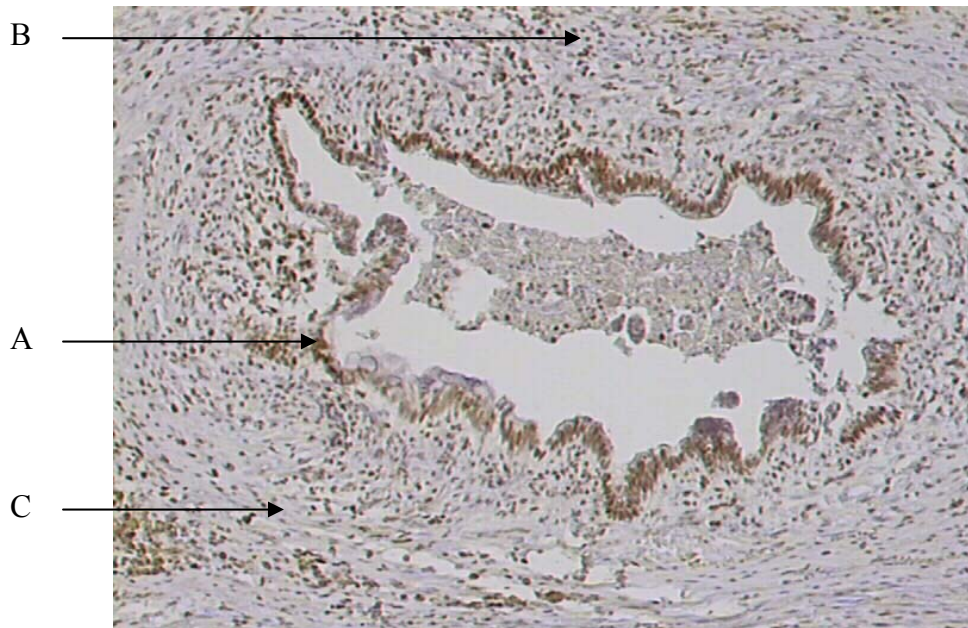


Abbildung 3.80

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (484204). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

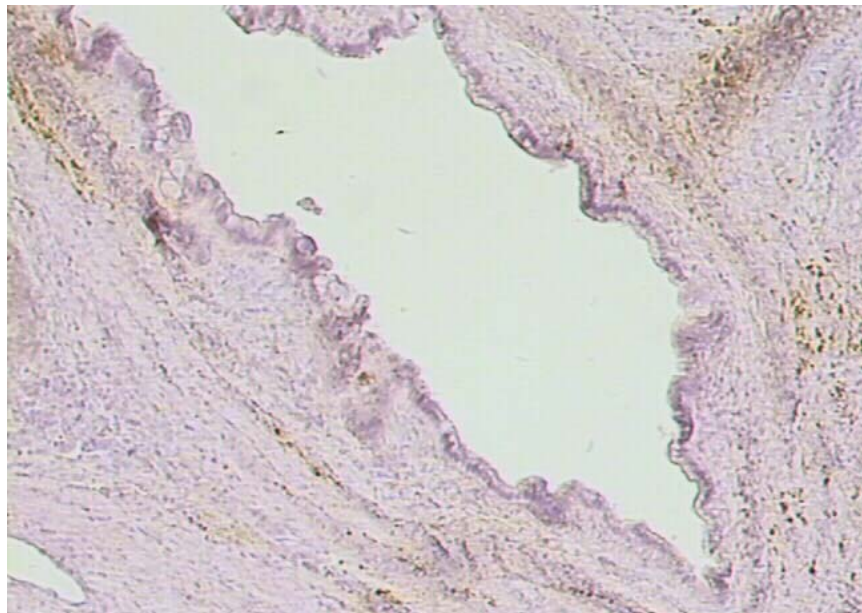


Abbildung 3.81

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.80 (484204). Mikroskopie 10x.

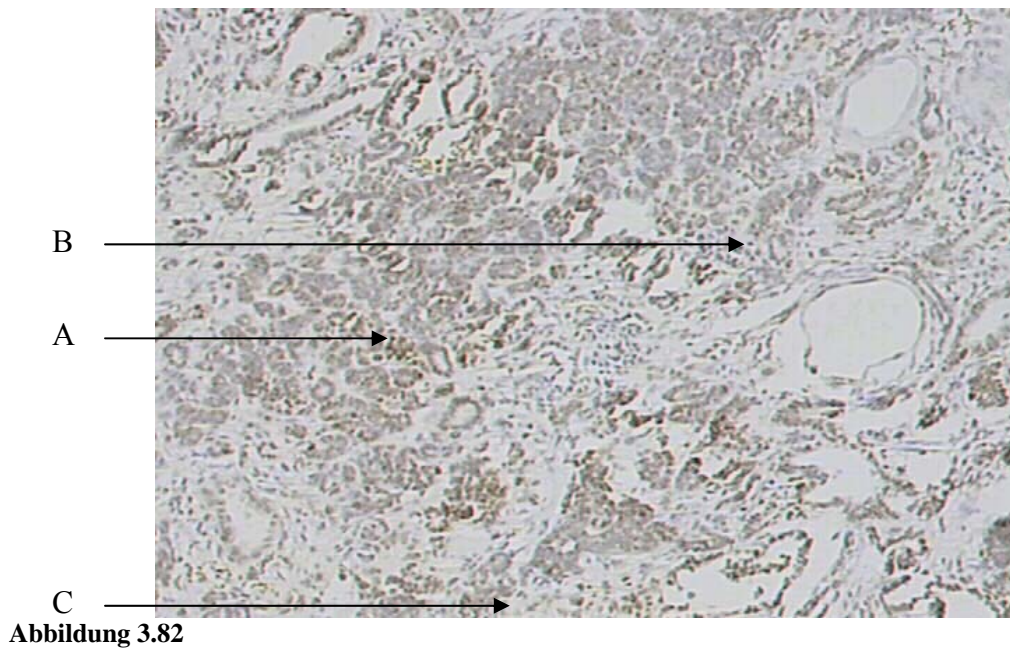


Abbildung 3.82

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (309140). A: Tumorzellen, schwache bis starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

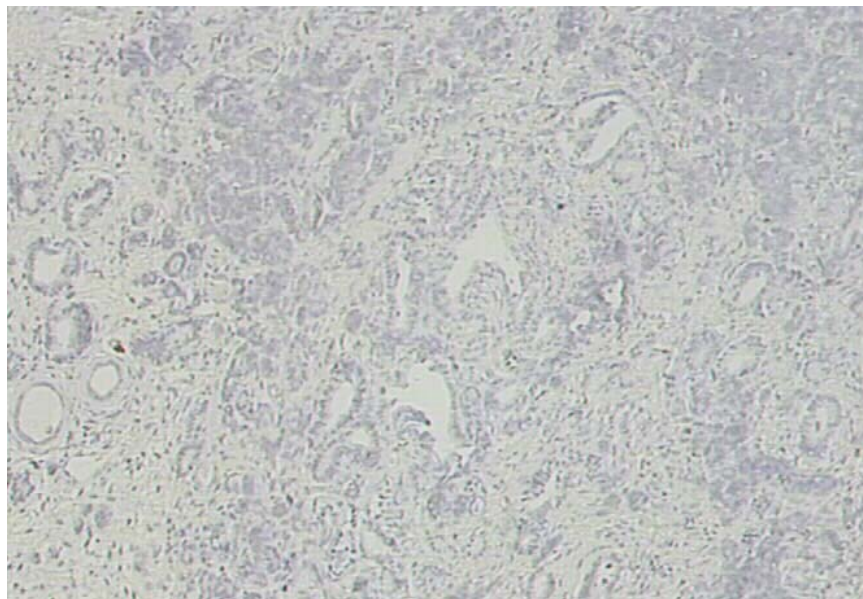


Abbildung 3.83

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.82 (309140). Mikroskopie 10x.

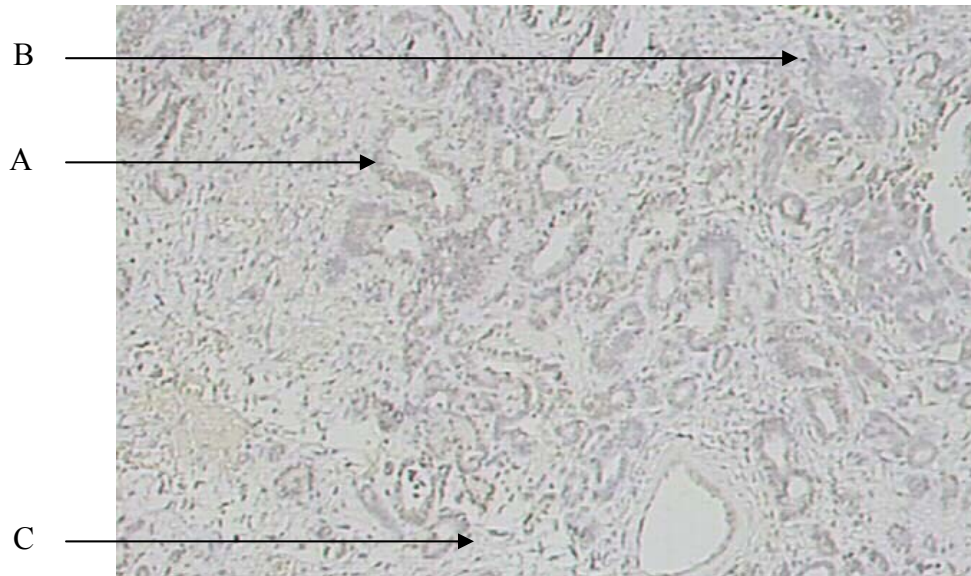


Abbildung 3.84

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms (309140). A: Tumorzellen, schwache Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

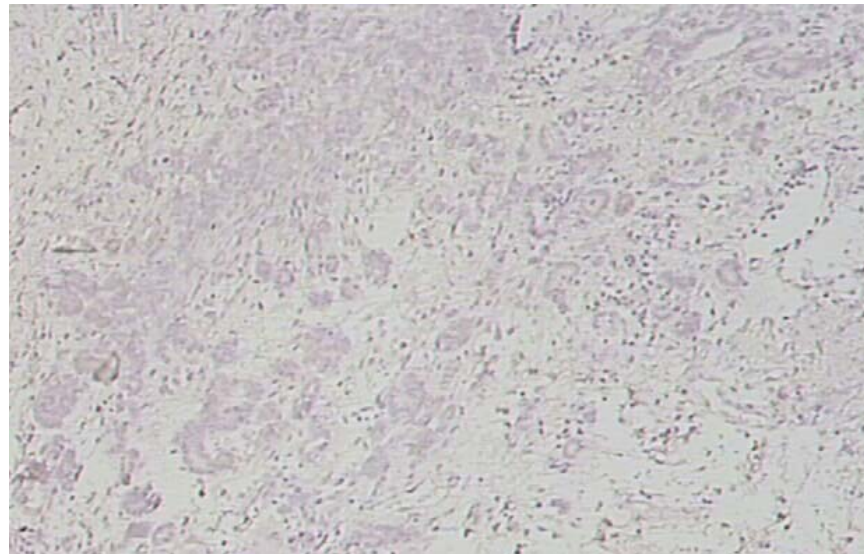


Abbildung 3.85

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase eines reifen Teratoms in Abbildung 3.84 (309140). Mikroskopie 10x.

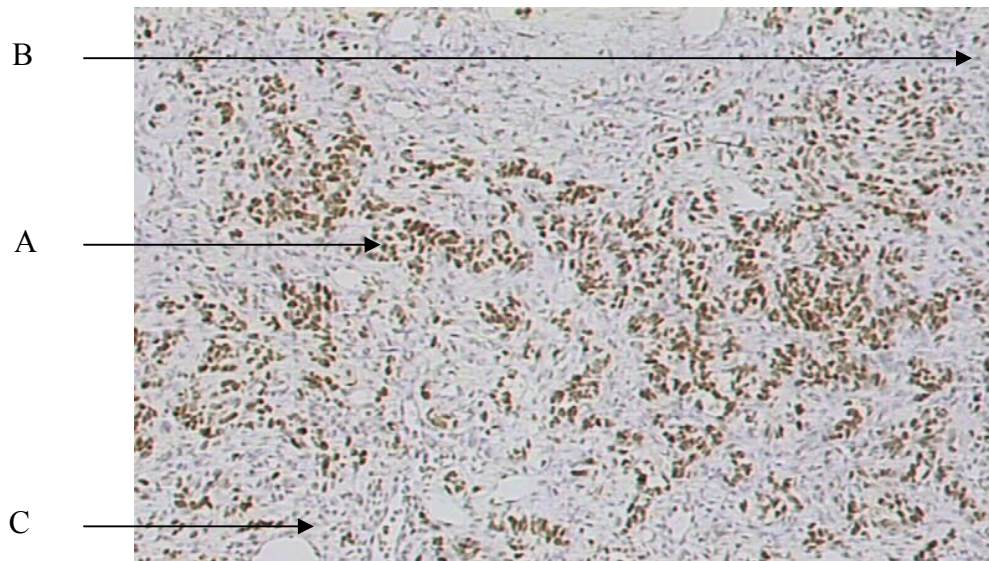


Abbildung 3.86

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einer Lymphknotenmetastase mit vitalen Tumorresten (49691). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

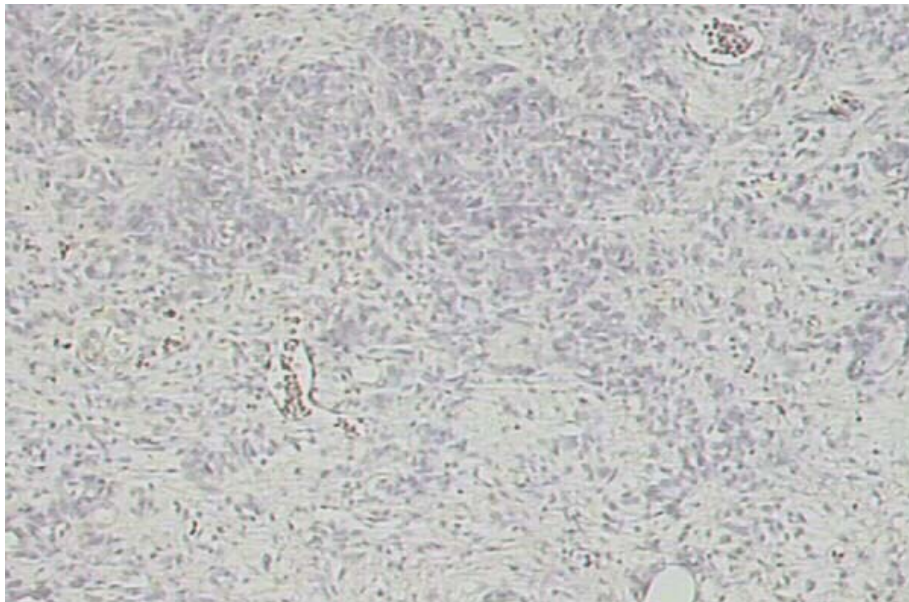


Abbildung 3.87

Negativ Kontrolle der auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase mit vitalen Tumorresten in Abbildung 3.86 (49691). Mikroskopie 10x.

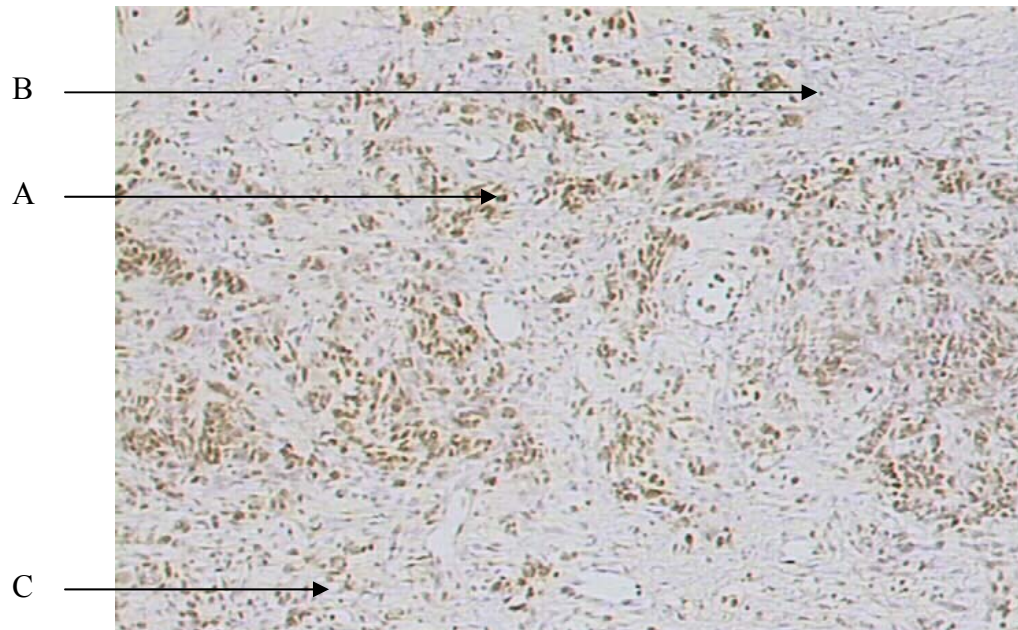


Abbildung 3.88

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einer Lymphknotenmetastase mit vitalen Tumorresten (49691). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

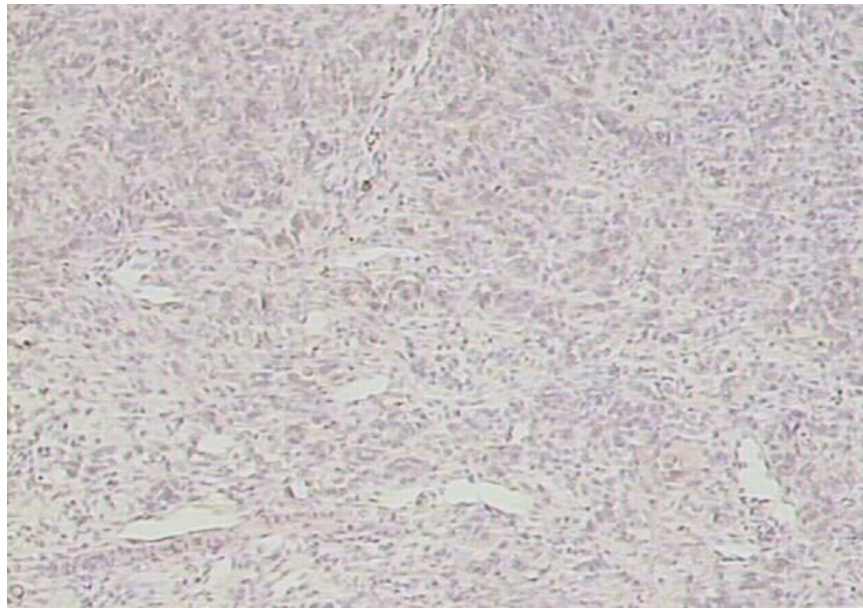


Abbildung 3.89

Negativ Kontrolle der auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Lymphknotenmetastase mit vitalen Tumorresten in Abbildung 3.88 (49691). Mikroskopie 10x.



Abbildung 3.90

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Embryonalen Karzinom (54217). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

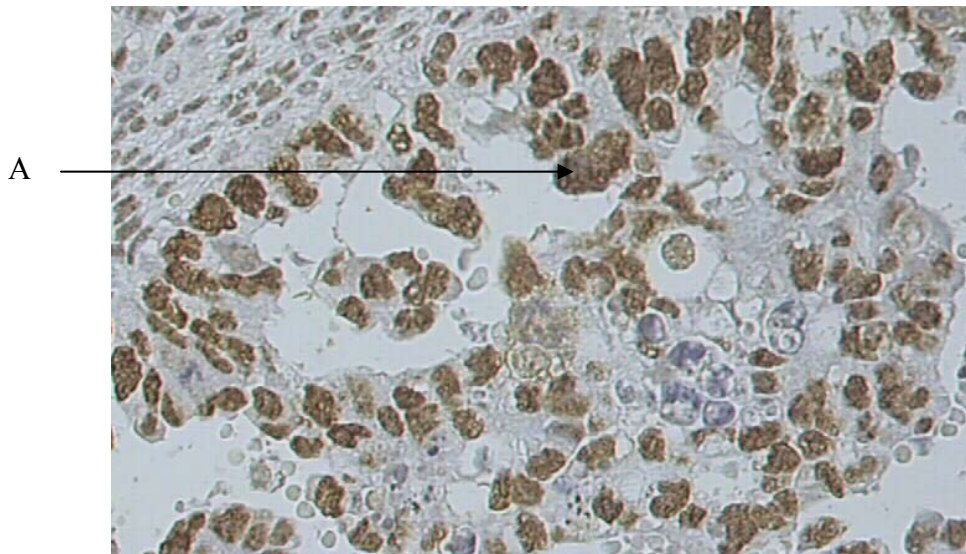


Abbildung 3.91

40 fache Vergrößerung des Embryonalen Karzinoms (anti-hMSH2 Expression) von Abbildung 3.90 (54217). A: Eine deutliche Kernanfärbung in den Tumorzellen ist zu erkennen.

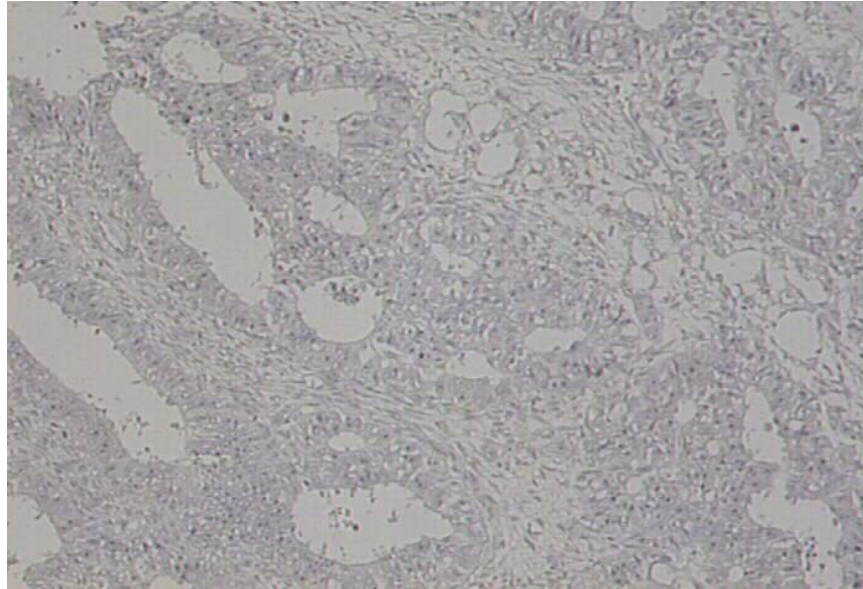


Abbildung 3.92

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms in Abbildung 3.90 (54217). Mikroskopie 10x.

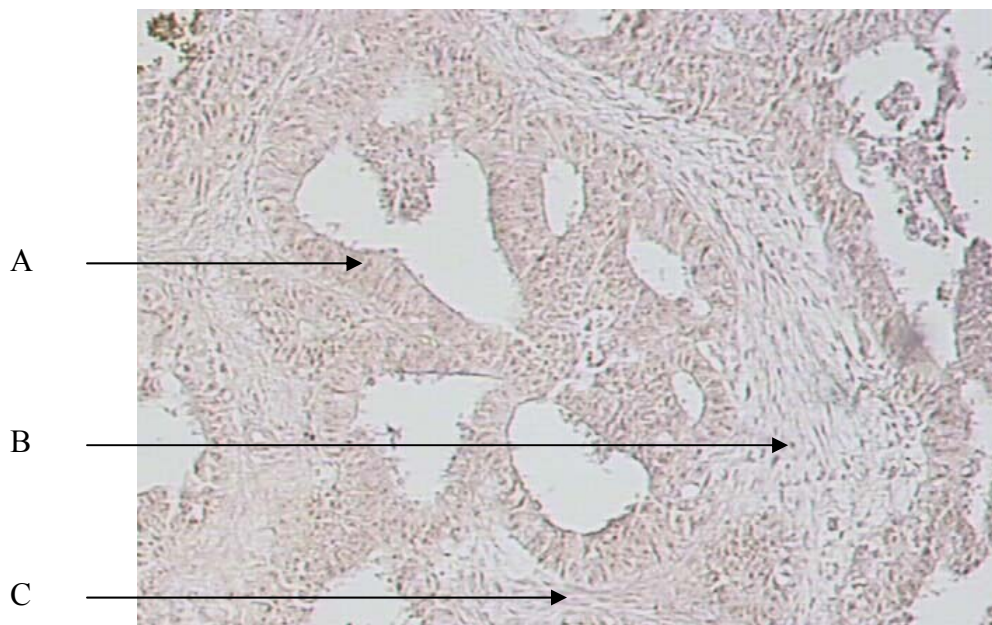


Abbildung 3.93

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Embryonalen Karzinom (54217). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

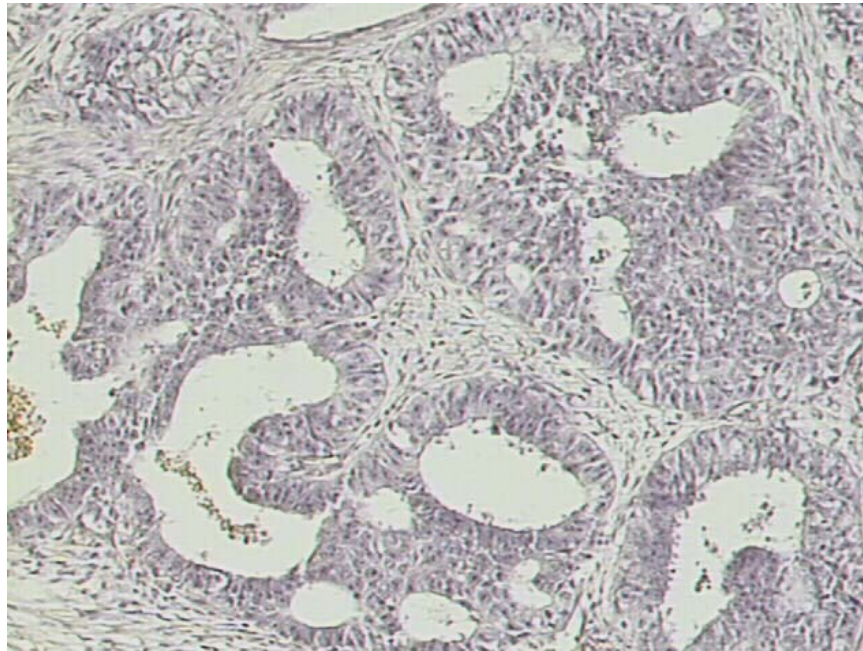


Abbildung 3.94

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms in Abbildung 5.82 (54217). Mikroskopie 10x.

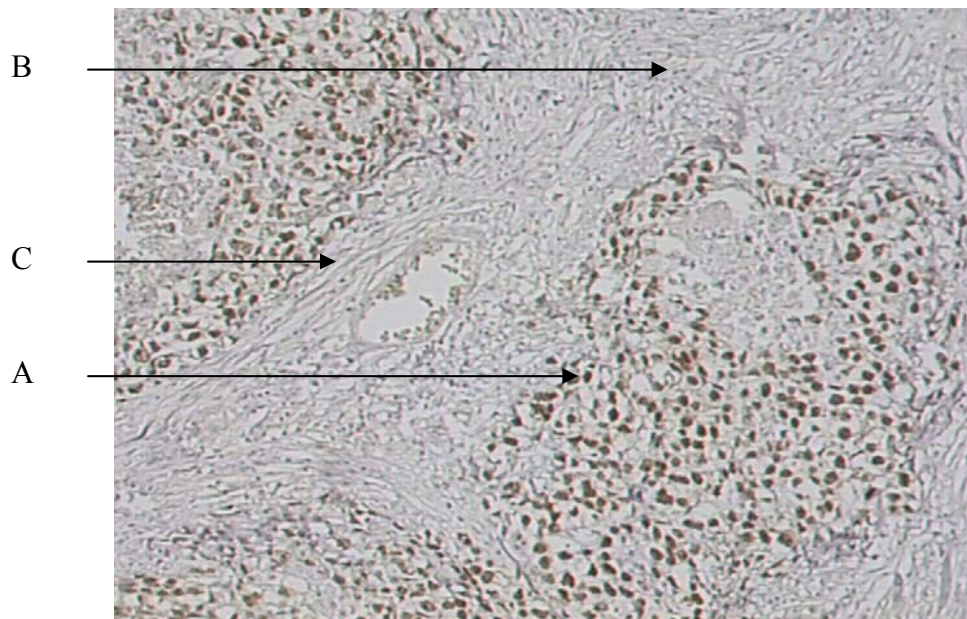


Abbildung 3.95

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Embryonalen Karzinom mit Chorion Karzinom (285926). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

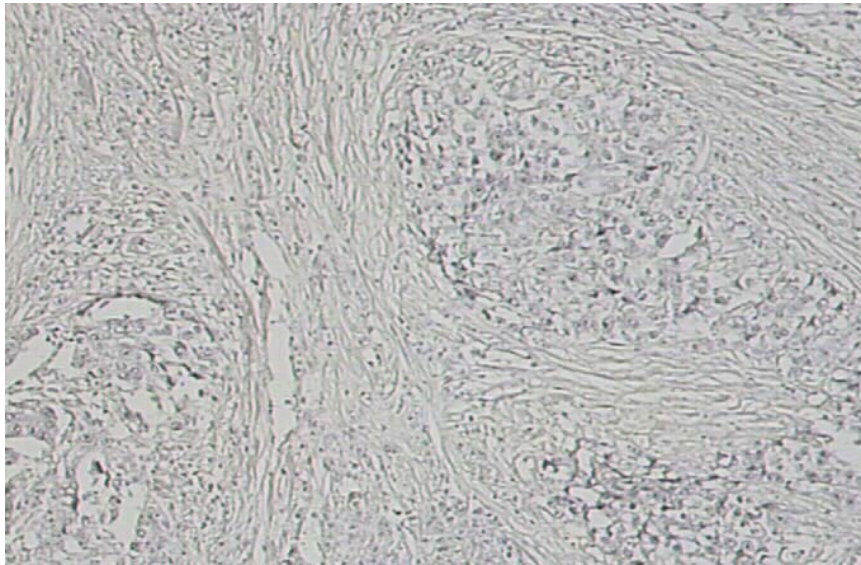


Abbildung 3.96

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms mit Chorion Karzinom in Abbildung 3.95 (285926). Mikroskopie 10x.

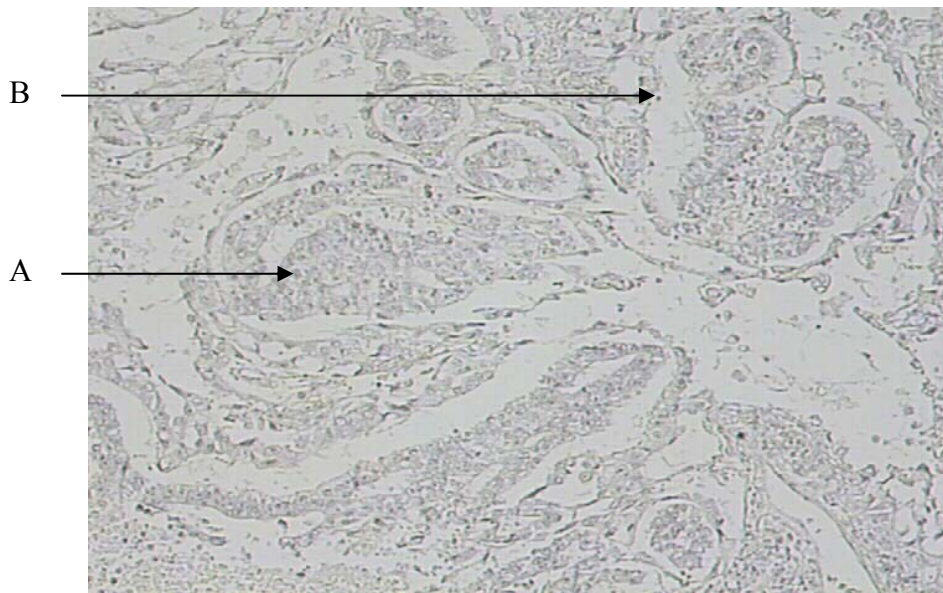


Abbildung 3.97

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Embryonalen Karzinom mit Chorion Karzinom (285926). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

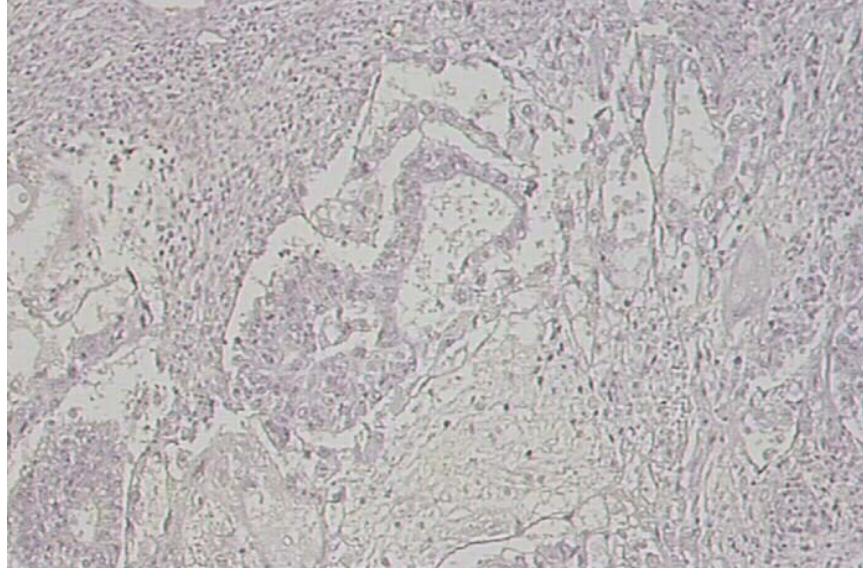


Abbildung 3.98

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms mit Chorion Karzinom in Abbildung 3.97 (285926). Mikroskopie 10x.

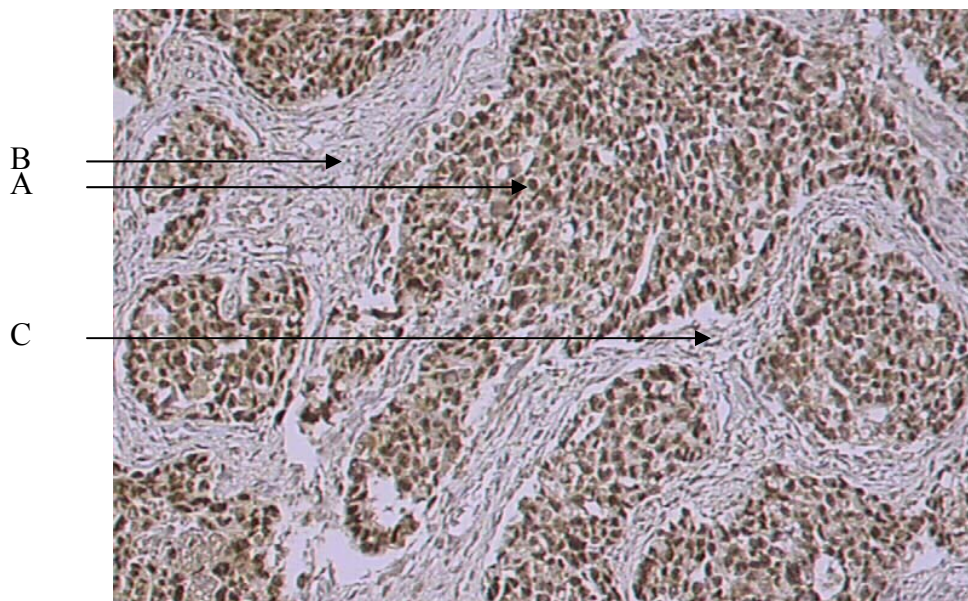


Abbildung 3.99

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem Embryonalen Karzinom mit Terato Karzinom (70285). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

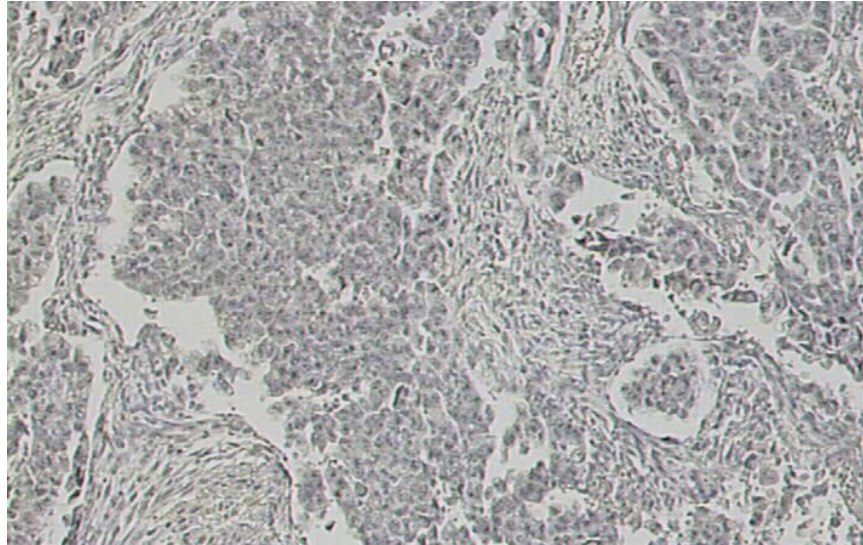


Abbildung 3.100

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms mit Terato Karzinom in Abbildung 3.98 (70285). Mikroskopie 10x.

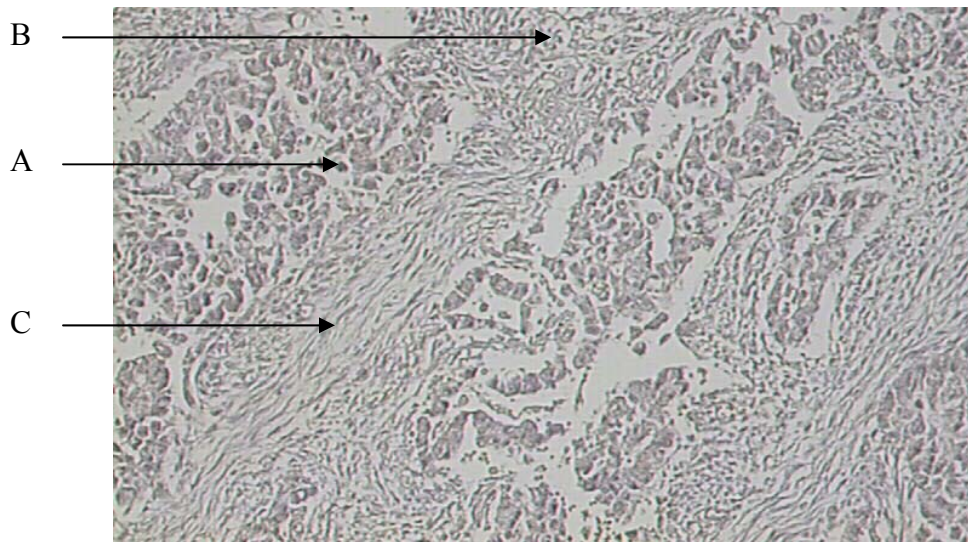


Abbildung 3.101

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem Embryonalen Karzinom mit Terato Karzinom (70285). A: Tumorzellen, keine Anfärbung. B: Lymphozyten, keine Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

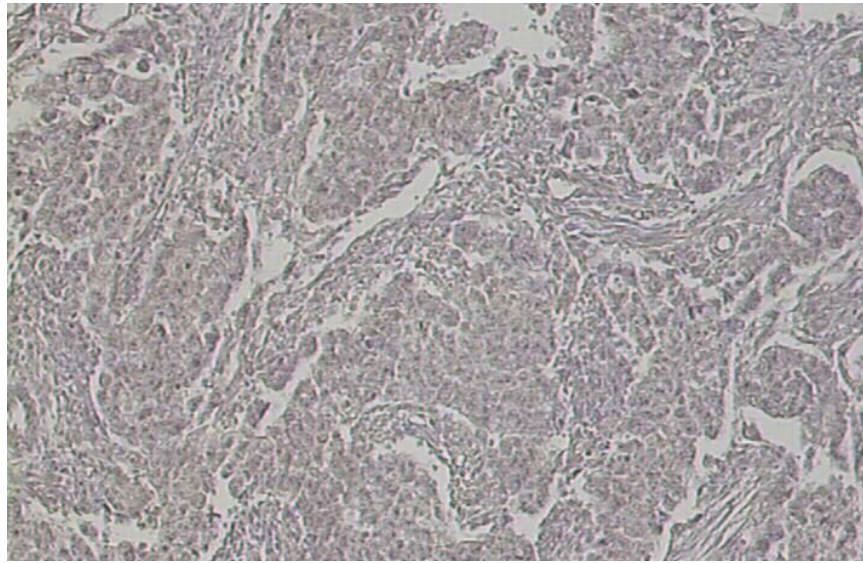


Abbildung 3.102

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Embryonalen Karzinoms mit Terato Karzinom in Abbildung 3.101 (70285). Mikroskopie 10x.

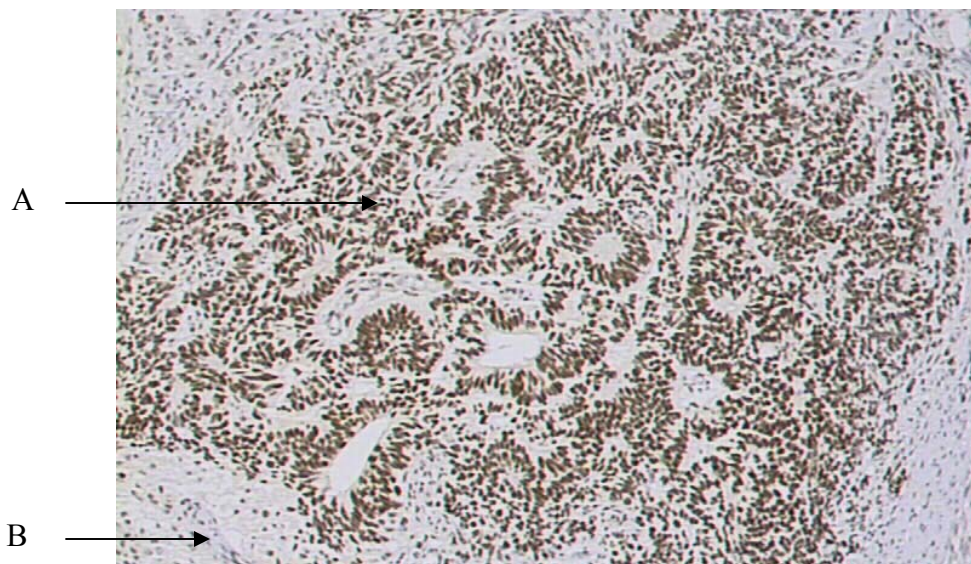


Abbildung 3.103

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem unreifen Teratom mit embryonal karzinomatösem Anteil (54217). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

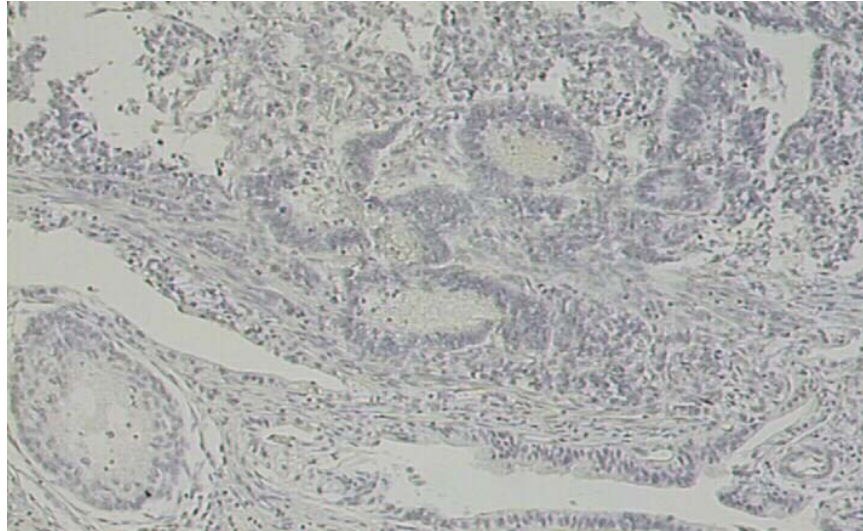


Abbildung 3.104

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten unreifen Teratoms mit embryonal karzinomatösem Anteil (54217) in Abbildung 3.103. Mikroskopie 10x.

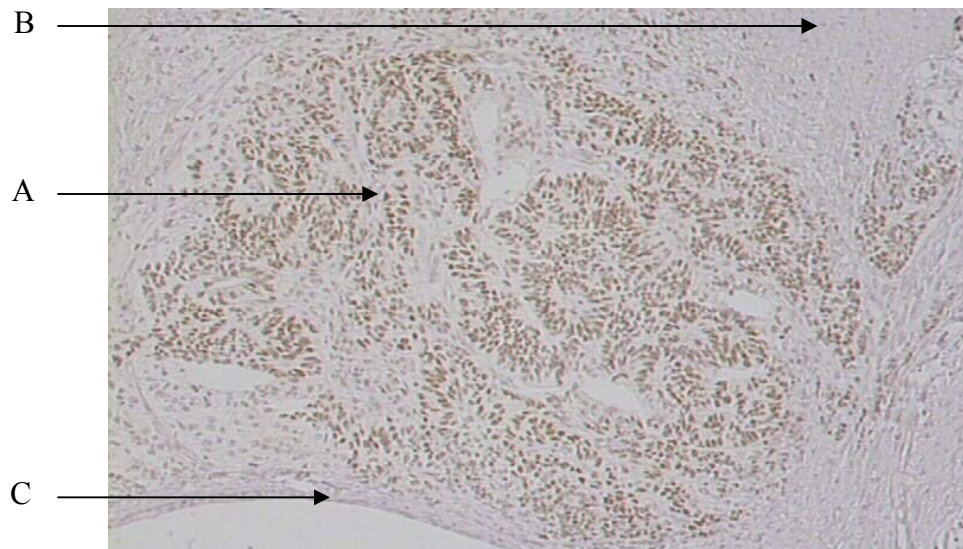


Abbildung 3.105

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem unreifen Teratom mit embryonal karzinomatösem Anteil (54217). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

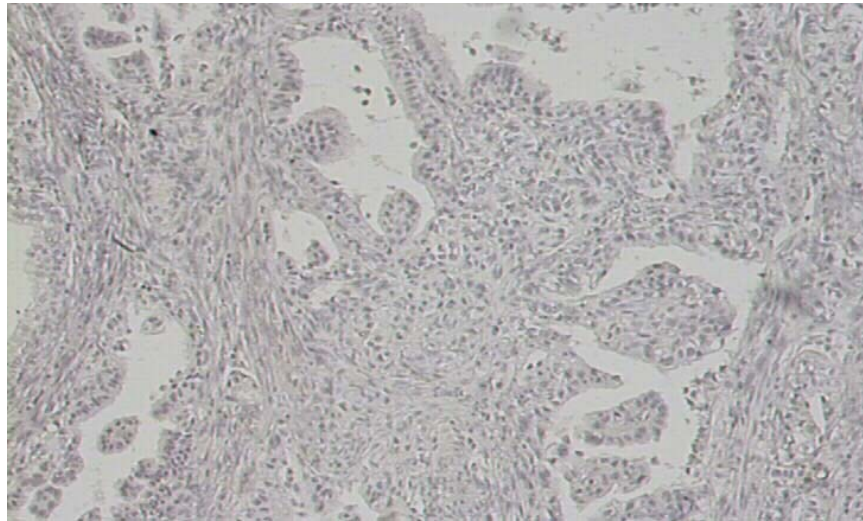


Abbildung 3.106

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten unreifen Teratoms mit embryonal karzinomatösem Anteil (54217) in Abbildung 3.105. Mikroskopie 10x.

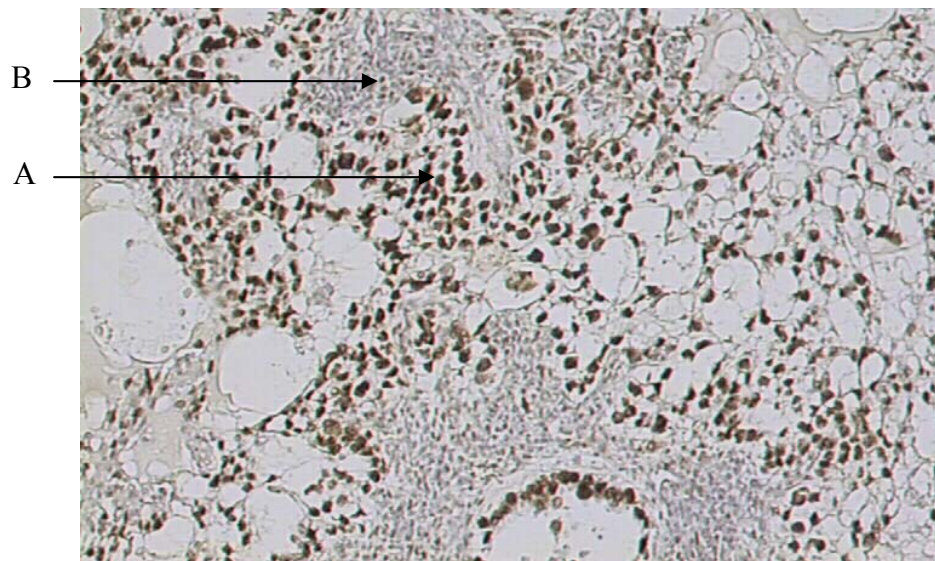


Abbildung 3.107

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem nichtseminomatösen Misch tumor (Embryonales- und Chorion Karzinom, Yolk-Sac und Teratom) (123967). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

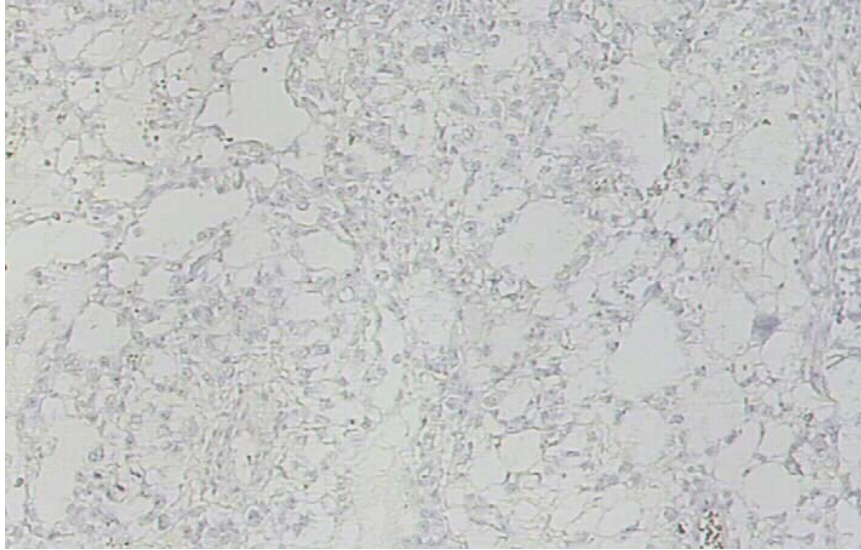


Abbildung 3.108

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten Mischtumors (123967) in Abbildung 3.107. Mikroskopie 10x.

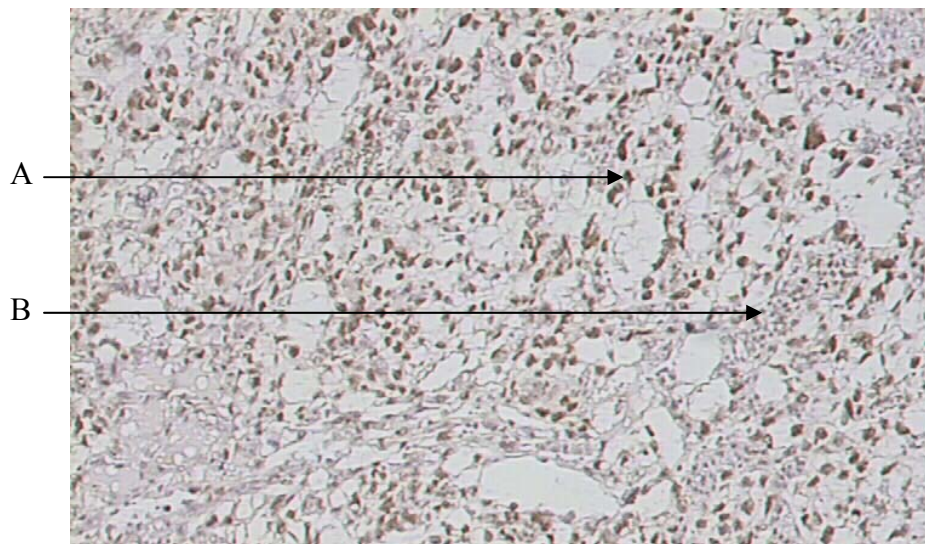


Abbildung 3.109

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem nichtseminomatösen Mischtumor (Embryonales- und Chorion Karzinom, Yolk-Sac und Teratom) (123967). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

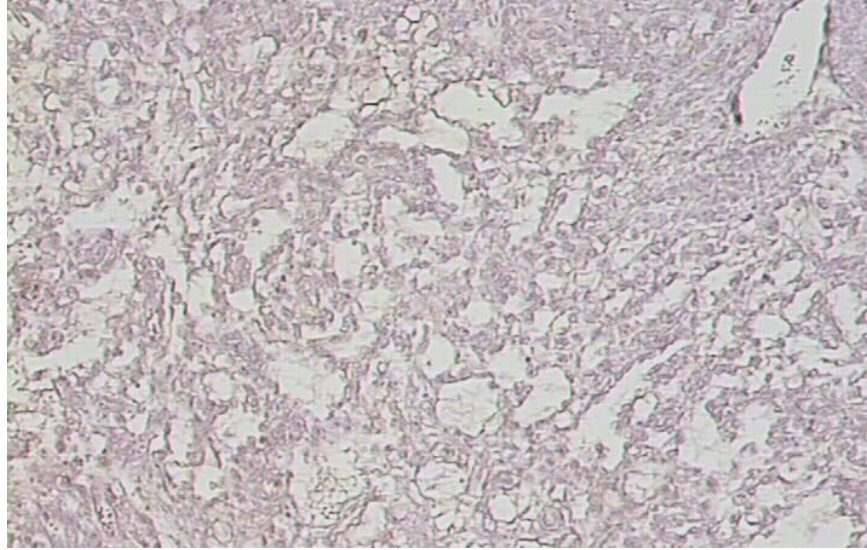


Abbildung 3.110

Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten Mischtumors (123967) in Abbildung 3.109. Mikroskopie 10x.

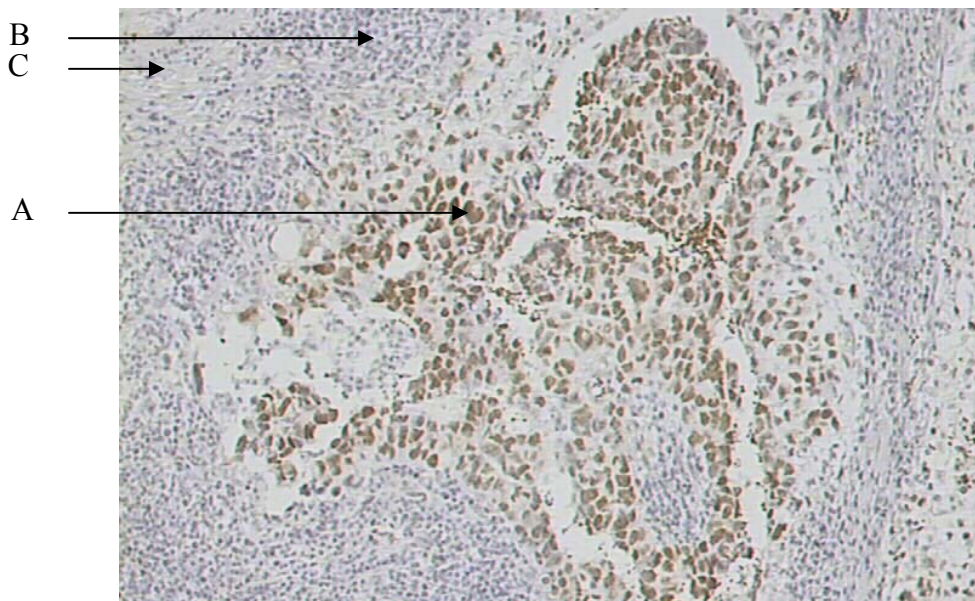


Abbildung 3.111

Analyse der anti-hMSH2 Expression in einem unreifen Teratom (Teratokarzinom) (484204). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. C: Bindegewebszellen, keine Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

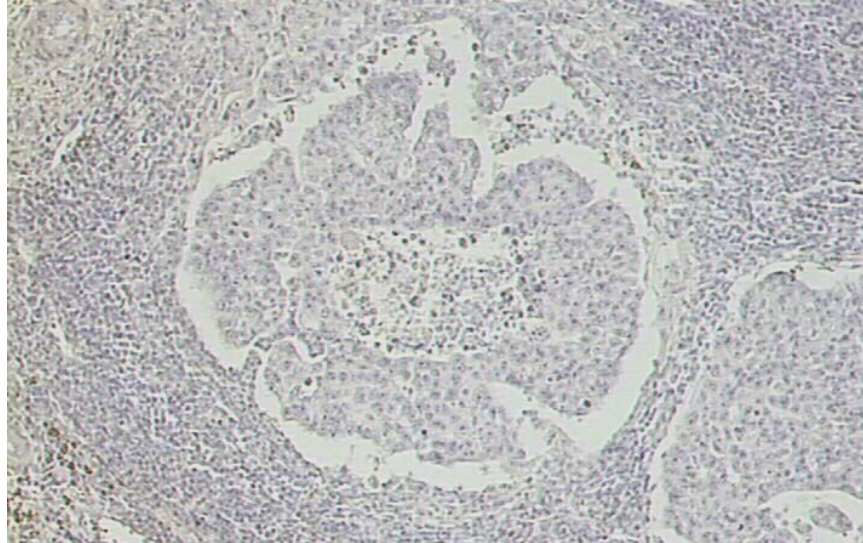


Abbildung 3.112

Negativ Kontrolle des auf anti-hMSH2 Expression untersuchten unreifen Teratom (484204) in Abbildung 3.111. Mikroskopie 10x.

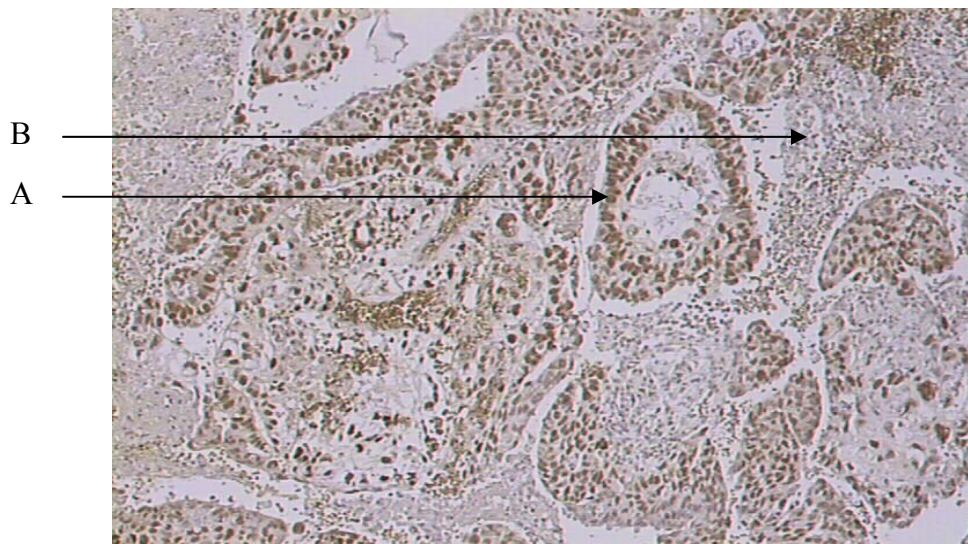


Abbildung 3.113

Analyse der anti-hMLH1 Expression in einem unreifen Teratom (Teratokarzinom) (484204). A: Tumorzellen, starke Anfärbung. B: Lymphozyten, keine bis schwache Anfärbung. Es handelt sich um eine Mikroskopie 10x.

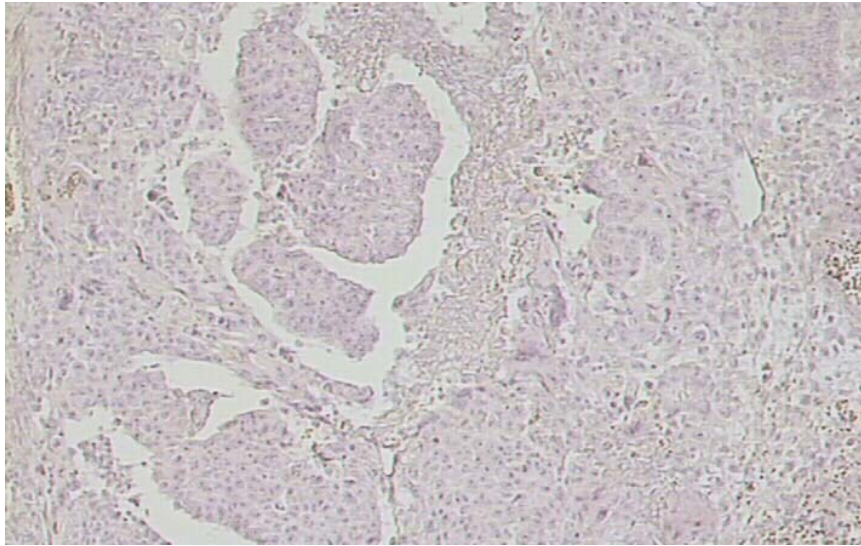


Abbildung 3.114

**Negativ Kontrolle des auf anti-hMLH1 Expression untersuchten unreifen Teratom (484204) in
Abbildung 3.113. Mikroskopie 10x.**

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt soll auf die Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen eingegangen werden. Zur Vereinfachung sind die immunhistochemischen Ergebnisse in einer Tabelle zusammengestellt.

4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Von den angefertigten Paraffinschnitten wurden alle zunächst nach HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt. So wurden die Schnitte mikroskopiert und auf ihre Histologie geprüft, bevor sie immunhistochemisch angefärbt wurden.

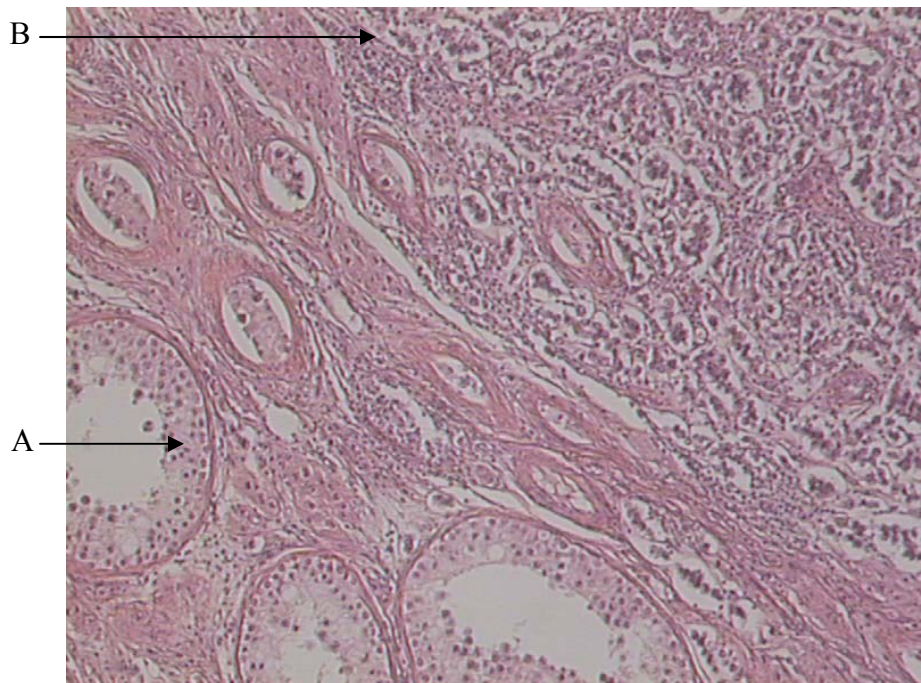


Abbildung 4. 1

Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Paraffinschnittes (PID 19385). Mikroskopie 10 fach.
Hier sieht man im oberen rechten Anteil (Pfeil B) ein Seminom. Im unteren linken Anteil (Pfeil A) Normalgewebe, Hodentubuli.

4.2 Immunhistochemische Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden durch immunhistochemische Analysen Mechanismen der Chemoresistenz beim testikulären Keimzelltumor untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen. Dadurch konnten die Bilder der computerunterstützten Auswertung zugeführt werden und zur Dokumentation abgespeichert werden. Zu jeder immunhistologischen Untersuchung wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Eine Positivkontrolle bedeutet die Inkubation mit dem Primär- (HMLH1 und HMSH2) und Sekundär-Antikörper. Bei der Negativkontrolle macht man die gleichen Arbeitsschritte wie bei der Positivkontrolle, jedoch keine Inkubation mit dem Primär-Antikörper.

Die folgende Tabelle ist eine Zusammenstellung der klinischen Information, Histologie und der immunhistochemischen Auswertung der Tumoren.

Tabelle 4. 1

Tumor: Primärtumor; LK: Lymphknoten; IHC: Immunhistochemie; +: Färbung; -: keine Färbung

Alter	PID	Tumor Histologie	LK Histologie	Grading	Stadium	IHC Tumor MLH1/MSH2	IHC LK MLH1/MSH2
28	54217	ECA	Teratom, unreif	T1	Ila	-/+	+/+
32	285926	ECA, Chorion Ca.	Teratom, unreif	T1	IIIb	-/+	
33	329919	ECA, Chorion Ca., Yolk-Sac, Teratom, unreif	Teratom, reif	T1	Ila		+/+
26	123967	ECA, Chorion Ca., Yolk-Sac, Teratom	Teratom, reif	T1	Ilc	+/+	-/+
35	70285	Teratokarzinom	Teratokarzinom	T1	Ila	-/+	
51	213457	Teratom, reif, Seminom	Restlymphom	T1	Ilc	-/+	
25	321984	Teratom, reif, unreif	Teratom	T1	IIIb	+/+	+/+
34	502203	ECA, Seminom	Teratom, reif	T2	IIIa		+/+
25	484204	Teratokarzinom, Chorion Ca., Yolk-Sac, Teratom	Teratom, reif	T2	IIIb	+/+	+/+
25	309140	Teratom, reif, unreif	Teratom, reif	T3	IIIa	-/-	-/-
35	496961	Teratom, reif, Yolk-Sac	Vitale Tumoreste	T4	IIIb	+/+	+/+
34	218868	Teratom	Teratom	T3	Ilb		+/+
24	224991	Seminom	Tumorfrei	T3	IIIc	+/+	
31	256121	Seminom	Teratom, reif	T2	Ilc	+/+	+/+
46	122025	Seminom	Tumorfrei	T2	IIIb	-/+	
28	178442	Seminom	Tumorfrei	T1	IIIb	-/-	

Ergebnisse

34	309038	Seminom	Seminom	T3	IIIa		+/+
29	19385	Seminom	Tumorfrei	T1	IIb	-/+	
38	211457	Seminom	Seminom	T1	IIc		+/+
34	150397	Seminom	Tumorfrei	T1	Ia	+/+	

Eine Gesamtzahl von 27 Tumoren bzw. Tumoren mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen oder Tumoren alleine oder auch Lymphknotenmetastasen alleine wurden in dieser Arbeit untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 32.4 Jahre. Der jüngste Patient war 24, der älteste Patient 51 Jahre alt. Einer der Patienten hatte einen Stadium I Tumor nach Lugano, 9 Patienten einen Stadium II und 10 Patienten einen Stadium III Tumor nach Lugano.

Die Tumoren wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen das hMLH1 sowie hMSH2-Protein überprüft. In den meisten Fällen wurde eine nahezu homogene Kernfärbung in allen Tumorzellen nachgewiesen. Die Färbungen waren auch homogen in den verschiedenen Tumoranteilen der nicht-seminomatösen Tumoren. 10 von 27 untersuchten Tumoren bzw. Lymphknotenmetastasen zeigten in der anti-hMLH1 Färbung ein schwaches oder kein Signal, 37%. 3 von 27 untersuchten Tumoren bzw. Lymphknotenmetastasen zeigten in der anti-hMSH2 Färbung ein schwaches oder kein Signal, 11%.

Seminom

7 von 8 Seminomen zeigten ein starkes Signal bei der Anfärbung mit anti-MSH2. Nur eine Probe zeigte keine Anfärbung mit anti-MSH2.

5 von 8 Seminomen zeigten ein starkes Signal bei der Anfärbung mit anti-MLH1. 3 Proben zeigten keine Anfärbung mit anti-MLH1.

Nur das Seminom mit der PID Nr. 178442 zeigte weder bei der Behandlung mit anti-MSH2 noch bei der Behandlung mit MLH1 ein Signal.

Reifes Teratom

5 von 6 der reifen Teratome zeigten ein starkes Signal in der anti-MSH2 Anfärbung.

4 von 6 reifen Teratomen zeigten ein starkes Signal in der anti-MLH1 Anfärbung.

Ergebnisse

2 von 6 reifen Teratomen zeigten ein schwaches Signal in der anti-MLH1 Anfärbung. Nur 1 von 6 reifen Teratomen zeigte kein Signal (PID Nr. 123967) in der anti-MLH1 Anfärbung.

Unreifes Teratom

Das untersuchte unreife Teratom zeigte ein starkes Signal in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1

Reifes und unreifes Teratom

Eine der als reif bzw. unreifes Teratom klassifizierten Proben zeigte jeweils in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 ein starkes Signal. Die andere Probe zeigte jeweils kein Signal in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 Färbung.

Teratom

Die beiden als Teratom klassifizierten Proben zeigten in der anti-MLH1 und anti-MSH2 ein positives Expressionsmuster.

Mischtumore

5 von 5 Mischtumoren zeigten ein starkes Signal in der anti-MSH2 Anfärbung.

3 von 5 Mischtumoren zeigten ein starkes Signal in der anti-MLH1 Anfärbung. 2 von 5 Mischtumoren zeigten kein Signal in der anti-MLH1 Anfärbung PID Nr. 285926 und 70285.

Embryonales Karzinom

Das einzige reine embryonale Karzinom zeigte in der anti-MSH2 Anfärbung ein starkes und in der anti-MLH1 Anfärbung ein schwaches Signal PID Nr. 54217.

Teratokarzinom

Das einzige Teratokarzinom zeigte in der anti-MLH1 ein negatives Expressionsmuster, in der anti-MSH2 Anfärbung eine positive Anfärbung.

Vitaler Tumorrest

Eine als „vitaler Tumorrest“ klassifizierte Probe zeigte jeweils positive Expressionsmuster in der anti-MLH1 und anti-MSH2 Anfärbung.

Expression der MMR in der Spermatogenese

Die Marker hMLH1 und hMSH2 hatten unterschiedliche Färbemuster in unpathologischen Tubuli seminiferi und malignem Gewebe. Der Marker hMLH1 wurde nur in Spermatogonien und frühen Spermatozyten exprimiert. Hingegen wurde der Marker hMSH2 in allen Stadien der Spermatogenese exprimiert.

4.3 Ergebnisse der Computerunterstützten Auswertung

Die Ergebnisse der Computerunterstützten Auswertung stimmen mit den morphologischen Ergebnissen der Immunhistochemie überein.

Die folgende Tabelle vergleicht die morphologischen Ergebnisse mit den Computerunterstützten Ergebnissen in den beiden linken Spalten. Die Auswertung wird in Prozent angegeben. Diese Zahl gibt darüber Auskunft, wie groß der Anteil der Braunfärbung war.

Tabelle 4. 2

Ergebnisse der Computerunterstützten Auswertung.

Alter	PID	IHC Tumor MLH1/MSH2	IHC LK MLH1/MSH2	Tumor MLH1/MSH2	Lymphknoten MLH1/MSH2
28	54217	-/+	+/+	0.94 %/11.38 %	4.9 %/18.19 %
32	285926	-/+		0 %/3.8 %	
33	329919		+/+		5.7 %/26 %
26	123967	+/+	-/+	8 %/11 %	0 %/21 %
35	70285	-/+		0 %/28 %	
51	213457	-/+		0.05 %/11.8 %	
25	321984	+/+	+/+	19 %/13 %	6 %/10 %
34	502203		+/+		4 %/0 %
25	484204	+/+	+/+	2 %/16 %	19 %/18 %
25	309140	-/-	-/+	0 %/0 %	0.7 %/2.5 %
35	496961	+/+	+/+	19 %/2.65 %	7.3 %/17 %
34	218868		+/+		9 %/18 %
24	224991	+/+		9.7 %/6 %	
31	256121	+/+	+/+	9.3 %/17 %	1 %/1 %
46	122025	-/+		0.2 %/17 %	
28	178442	-/-		0.02 %/0.03 %	
34	309038		+/+		3.2 %/3.5 %
29	19385	-/+		0 %/10 %	
38	211457		-/+		0.8 %/12 %
34	150397	+/+		24 %/20 %	

Seminom

7 von 8 Seminomen zeigten eine hohe Prozentrage der detektierten Braunfärbung bei der Anfärbung mit anti-MSH2. Nur eine Probe zeigte keine ausreichende Detektion bei der Anfärbung mit anti-MSH2.

5 von 8 Seminomen zeigten eine hohe Prozentrage der detektierten Braunfärbung bei der Anfärbung mit anti-MLH1. 3 Proben zeigten keine Detektion bei der Anfärbung mit anti-MLH1.

Ergebnisse

Nur bei dem Seminom mit der PID Nr. 178442 konnte weder bei der Behandlung mit anti-MSH2 noch bei der Behandlung mit MLH1 eine ausreichende Braunfärbung detektiert werden.

Reifes Teratom

Bei 5 von 6 der reifen Teratome konnte eine starke Braunfärbung in der anti-MSH2 Anfärbung detektiert werden.

Bei 4 von 6 reifen Teratomen konnte eine starke Braunfärbung in der anti-MLH1 Anfärbung detektiert werden.

Bei 2 von 6 reifen Teratomen wurde eine geringe Braunfärbung in der anti-MLH1 Anfärbung detektiert. Nur bei 1 von 6 reifen Teratomen konnte keine Braunfärbung in der anti-MSH2 Anfärbung detektiert werden

Unreifes Teratom

Bei dem untersuchten unreifen Teratom konnte eine starke Braunfärbung in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 Anfärbung detektiert werden.

Reifes und unreifes Teratom

In der einen als reif bzw. unreifes Teratom klassifizierten Proben konnte jeweils in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 eine starke Braunfärbung detektiert werden. Die andere Probe zeigte keine Detektion in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 Färbung

Teratom

In beiden als Teratom klassifizierten Proben konnte eine starke Braunfärbung in der anti-MSH2 sowie in der anti-MLH1 Anfärbung detektiert werden.

Mischtumore

Bei 5 von 5 Mischtumoren konnte eine starke Braunfärbung in der anti-MSH2 Anfärbung detektiert werden. 3 von 5 Mischtumoren zeigten eine hohe Detektion in der anti-MLH1 Anfärbung. Bei 2 von 5 Mischtumoren konnte keine Braunfärbung in der anti-MLH1 Anfärbung detektiert werden, PID Nr. 285926 und 70285

Embryonales Karzinom

Das einzige reine embryonale Karzinom zeigte einen hohen Prozentwert in der Detektion der anti-MSH2 Anfärbung, sowie in der anti-MLH1 Anfärbung einen niedrigen Prozentwert. PID Nr. 54217.

Teratokarzinom

Das einzige Teratokarzinom zeigte in der anti-MLH1 Anfärbung keine Detektion, in der anti-MSH2 Anfärbung eine positive Detektion.

Vitaler Tumorrest

Eine als „vitaler Tumorrest“ klassifizierte Probe zeigte jeweils in der anti-MLH1 und anti-MSH2 Anfärbung eine positive Detektion.

Bei sorgfältiger Prüfung der Unterschiede in der Auswertung der Anfärbungen mittels morphologischer Methoden einerseits und der computerunterstützten Auswertung andererseits ergab sich, dass die Software QWin der Komplexität und Variabilität der histologischen Schnitte nicht angemessen war und keine ausreichende User-Interaktion zur Verfügung stellte, um die Software an die konkreten Schwierigkeiten anzupassen.

5 Diskussion

Es ist bekannt, dass die HNPCC unter den CRC eine Sonderstellung in zweifacher Hinsicht einnehmen. Erstens liegt in 90% der HNPCC eine Mikrosatelliten Instabilität (MSI) vor und zweitens zeigen HNPCC eine Chemoresistenz. Die MSI bei sporadischen CRC liegt indessen nur bei 15% - 20% vor. Für Patienten mit HNPCC ist also die Detektion des Primarius weit vor der Metastasierung von besonderer Relevanz. Da der Verlust des Mismatch Repair Systems (MMR) notwendige Voraussetzung für MSI ist, liegt es bei familiärem CRC nahe, auf Verlust des MMR zu testen, um gegebenenfalls die Screeningstrategie für diese Population so anzupassen, dass ein potenzieller Primarius möglichst früh detektiert wird. Außerdem hat das Vorliegen eines Verlustes des MMR bei HNPCC Konsequenzen für die Therapie und ihr Monitoring.

In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, ob und auf welche Tumorentitäten ähnliche Überlegungen anzuwenden sind. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Keimzelltumoren (KZT). Es ist bekannt, dass 90% der Patienten mit einem fortgeschrittenen, metastasierten Keimzelltumor geheilt werden können. In ca. 10% der Fälle trifft man jedoch auf eine Chemoresistenz, also ein nicht Ansprechen auf die bekannten Chemotherapeutika. In Analogie zu den Verhältnissen bei HNPCC ergibt sich deshalb die interessante Frage, ob Chemoresistenz bei Keimzelltumoren mit einer MSI bzw. einem Verlust des MMR gepaart ist. Gegebenenfalls ließen sich dann auch hier Strategien für Gentests in einem Screeningcontext oder Therapiemonitoring ableiten, von denen Patienten mit chemoresistenten KZT profitieren könnten. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der Korrelation von chemoresistenten KZT mit dem Vorliegen eines Verlustes der MMR im Material des Primarius. In diesem Zusammenhang ist es darüber hinaus von Interesse zu untersuchen, ob bei vorliegendem Verlust des MMR im Material des Primarius auch ein Verlust des MMR im Material der metastasierten Lymphknoten festgestellt werden kann.

In einer neueren Studie (Heidenreich, A, Peitgen, E, 2006) wurde die Fragestellung erweitert: Gegenstand der Studie war die Bedeutung der prognostischen Signifikanz der Vorhersage von Nekrosen in residuellen Tumoren bei nicht seminomatösen KZT nach systemischer Chemotherapie auf der Grundlage von klinischen, pathohistologischen und

molekularen Markern unter Einschluss der immunhistochemischen Expression insbesondere von MDR-1 (multidrug resistance protein) sowie der MMR hMLH1 und hMSH2. Im Hinblick auf die Marker hMLH1 und hMSH2 wurde gezeigt, dass diese eine deutlich höhere Expression in den KZT zeigen, die mit einer Nekrose bzw. Fibrose in den Residualtumoren assoziiert sind. Das Fehlen der MDR-1 Expression im Primarius korrelierte signifikant mit Nekrosen bzw. Fibrosen in den residualen retroperitonealen Lymphknoten.

Das Problem der Chemoresistenz anderer Tumoren ist bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden. Insbesondere die Arbeit von Aebi, S, Fink D, et al. 1997 war hier von Interesse. Die Arbeit postuliert, dass der Verlust des MMR ein häufiges Vorkommnis bei sporadischen und erblichen Tumoren wie das HNPCC ist. Ein Verlust von entweder hMLH1 oder hMSH2 bedingte ein reduziertes Ansprechen auf Cisplatin, Carboplatin und Etoposid. Die Gruppe um Samimi und Fink, 2000 beschäftigten sich mit der Chemoresistenz beim Ovarialkarzinom. Sie untersuchten die Expression der zwei MMR-Gene hMLH1 und hMSH2 vor und nach Chemotherapie. Sie zeigten, dass die hMLH1 und hMSH2 Anfärbungen nach der Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin enthaltenden Chemotherapeutika signifikant abnahmen. Die Expression von hMLH1 und hMSH2 korrelierte mit den CA125 Werten vor Beginn der Behandlung. Die Expression von hMSH2 korrelierte mit den Veränderungen der CA125 Werte nach Behandlung. Diese Ergebnisse begründeten die Idee, dass auch bei den wenigen Fällen der chemorefraktären testikulären Keimzelltumoren ein Verlust des Mismatch Repair Systems, insbesondere der Verlust von hMLH1 sowie hMSH2 eine bedeutende Rolle spielen könnten. Tumoren mit Verlust des MMR könnten dann von Anfang an anders behandelt werden, Patienten könnten einem angepassten Therapiemonitoring , bzw. einer optimierten Chemotherapie zugeführt werden, um Nebenwirkungen zu vermeiden und kosteneffizienter zu therapieren. Schließlich könnten bei positiver Korrelation angepasste Screeningstrategien bei Vorliegen von familiären Keimzelltumoren angedacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals insgesamt 27 chemoresistente Keimzelltumoren im Sinne der oben vorgestellten Fragestellung untersucht. Es handelte sich um Primärtumore sowie, sofern verfügbar, die nach RPLA entfernten Lymphknoten. Insgesamt zeigten ca. 48% der untersuchten KZT (Primärtumor und/oder

Lymphknotenmetastase) ein schwaches oder kein Signal in den immunhistochemischen Anfärbungen gegen hMLH1 und hMSH2. Im Einzelnen zeigten 37% der KZT eine verminderte Expression von hMLH1, und bei 11% der KZT war die hMSH2 Expression herabgesetzt. In einem Fall, einem metastasierenden Teratom, waren beide Expressionen vermindert. Mit insgesamt weniger als 50% ist eine eindeutige Ablehnung oder Bestätigung der Hypothese, dass ein Verlust der MMR-Gene beim testikulären Keimzelltumor mit einer Chemoresistenz korreliert, nicht möglich. Allerdings belegen die Ergebnisse, dass ein Zusammenhang anzunehmen ist und es sich lohnen sollte, eine weitergehende Stratifizierung zu entwickeln, etwa entlang einer Mutation des p53 Gens. Schließlich ist festzustellen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit in der neueren Studie (Heidenreich, A, Peitgen, E, 2006) untermauert werden. In 85 Fällen, in denen sowohl Primären und assoziierte Residualtumore bewertet werden konnten zeigte sich, dass eine starke Expression von hMLH1/hMSH2 im Primarius zu 65% mit einer Nekrose in den resezierten Residualtumoren korrelierte. Negative Expression von hMLH1/hMSH2 im Primarius hingegen zeigte auch hier keinen wesentlichen Hinweis auf Vorliegen von vitalem Tumor (zu 20%), Teratom (zu 35%) oder Nichtvorliegen einer Nekrose (zu 55%) in den Residualtumoren.

Nachdem die Resultate dieser Arbeit vorlagen, wurden die Ergebnisse aus zwei anderen Arbeitsgruppen bekannt, die sich einer ähnlichen Fragestellung annahmen. Zum einen die Arbeitsgruppe Mayer et al. 2002, deren Arbeit zu dem Schluss kommt, dass es in der Tat eine Mikrosatelliten Instabilität (MSI) bei testikulären Keimzelltumoren gibt, bzw. mangelnde Expression von MMR, und diese mit einer Resistenz zu systemischer Chemotherapie einhergeht. Hier sind insgesamt 100 nicht selektierte Keimzelltumoren untersucht worden, jedoch nur 11 Präparate von chemoresistenten Hodentumoren. Die Ergebnisse der Immunhistochemie sahen wie folgt aus: Alle Tumore wurden auf das Vorhandensein von hMLH1, hMSH2 sowie hMSH6 untersucht. Die meisten Fälle zeigten eine intensive, homogene Kernfärbung. Nur 3 der 100 Kontrolltumoren, aber 4 der 11 refraktären Tumore (36%) zeigten ein deutlich herabgesetztes Signal in allen 3 Färbungen (hMLH1, hMSH2, hMSH6). Im Detail waren es 9% der auf hMSH2, 9% der auf hMSH6, sowie 36% der auf hMLH1 untersuchten refraktären Keimzelltumoren. Die Arbeit von Mayer et al. konstatiert schlussfolgernd den Beweis, dass eine MSI mit einer

Chemoresistenz einhergeht. Im Hinblick auf die Datenlage erscheint eine so weitgehende Aussage zweifelhaft. Allerdings erscheint es bemerkenswert, dass die in der Arbeit von Mayer et al. gefundenen Proportionen, denen in der vorliegenden Arbeit gut entsprechen. Im Übrigen stellen Mayer et al. jedoch auch fest, dass eine rein immunhistochemische Auswertung der MMR Proteine hMLH1, hMSH2 sowie hMSH6 nicht sensitiv und selektiv genug ist, um MSI bei Keimzelltumoren vorherzusagen. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass die Immunhistochemie über eine ausreichende Aussagekraft verfügt. Die Arbeitsgruppe Marcus et al. zeigten dieses bei immunhistochemischen Färbungen von hMLH1 und hMSH2 beim kolorektalen Karzinom. Alle 34 Mikrosatelliten stabile Tumoren zeigten auch eine intakte Kernanfärbung mit hMLH1 und hMSH2 Antikörpern. Dagegen zeigten 37 von 38 Tumoren, die eine Mikrosatelliten Instabilität aufwiesen, auch keine Kernanfärbung von hMLH1 und/oder hMSH2. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 100%.

Eine andere Arbeitsgruppe, die sich mit der Frage der Expression von hMLH1 und hMSH2, sowie der Mikrosatelliten Instabilität bei Keimzelltumoren beschäftigt hat, ist die Arbeitsgruppe um Devouassoux-Shisheboran, M et al. 2001. Hier ging es jedoch nicht um die Fragestellung der Auswirkung einer Mikrosatelliten Instabilität bzw. nicht Expression von MMR-Proteinen auf die Chemosensitivität, sondern die Bedeutung der MMR- Insuffizienz bei Keimzelltumoren insgesamt. In dieser Arbeit wurden alle testikulären Keimzelltumore einer immunhistochemischen sowie einer molekularbiologischen (Mikrosatelliten Analyse) Untersuchung unterworfen. Es wurden insgesamt 19 Tumore untersucht. Alle zeigten eine intakte Kernfärbung mit den Antikörpern gegen hMLH1 und hMSH2. Die Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der Mikrosatelliten Analyse überein. Diese Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluss, dass im Gegensatz zu Tumoren epithelialen Ursprungs, vor allem bei den HNPCC assoziierten Neoplasien, eine Mikrosatelliten Instabilität oder veränderte Expression von hMLH1 und hMSH2 bei der Entwicklung testikulärer Keimzelltumore keine Rolle spielt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sowie der Arbeitsgruppe von Mayer et al. sowie Devouassoux-Shisheboran et al. stehen nicht im Widerspruch zueinander. Allerdings sind die Schlussfolgerungen von Devouassoux-Shisheboran et al. in Relation zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Mayer et al. in Frage zu

stellen. Devouassoux-Shisheboran et al. stratifizierten nicht nach chemorefraktären Tumoren und untersuchten eine eher geringe Fallzahl (19). Immerhin könnte es sein, dass in diesen Fällen kein chemoresistenter Tumor eingeschlossen war. Es bleibt festzustellen, dass die ähnliche prozentuale Verteilung der Keimzelltumoren mit fehlender Expression von hMLH1 und hMSH2 in der Arbeitsgruppe von Mayer et al. sowie der hier vorliegenden Arbeit, Anlass sein sollte, die Ausgangshypothese in Analogie der Verhältnisse bei HNPCC im Sinne einer weiteren Stratifizierung von KZT zu verfolgen. Als kritisch zu beurteilen ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nur immunhistochemische Methoden zum Einsatz kamen. So wurde nur das Vorhanden- bzw. nicht Vorhandensein der MMR-Proteine hMLH1 sowie hMSH2 mittels Immunhistochemie untersucht. Die vorher zitierten Arbeiten konnten die Ergebnisse durch molekularbiologische Methoden mit dem Nachweis der Mikrosatelliten Instabilität untermauern. Die Arbeitsgruppe von Devouassoux-Shisheboran et al. bestätigte jedoch die Immunhistochemie bei Keimzelltumoren als valide Methode, da Immunhistochemie und MSI-Analyse übereinstimmten.

Andere Arbeitsgruppen haben die Chemoresistenz des Hodentumors auf der Grundlage von p53 analysiert. Burger et al. konnten an Hodentumorzelllinien keine Korrelation zwischen p53- und Bcl-2 Status und der Cisplatin-induzierten Apoptose darstellen, während Eid et al. eine gute Korrelation zwischen hoher p53-Proteinexpression, geringer Mdr-1 Proteinexpression und therapeutischem Ansprechen beschreiben.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Arbeiten sollte auch eine Arbeit der Gruppe um Lin, X et al. 2001 erwähnt werden. Hier wurde für CRC gezeigt, dass eine Mutation von p53 oder Verlust von MMR allein nur einen kleinen Effekt auf die Sensitivität der Wirkung von DDP bei humanen CRC Zellen hat. Eine Mutation von p53 gemeinsam mit Verlust von MMR zeigte jedoch eine Erhöhung für das Auftreten einer Chemoresistenz um das 1,7- bis 6,5-fache.

So wäre es denkbar, auch bei testikulären Keimzelltumoren zu untersuchen, wie Mutationen von p53 zusammen mit Verlust von MMR mit Chemoresistenz korreliert.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nicht nur Primarien sondern auch Metastasen untersucht worden sind, soll noch einmal hervorgehoben werden. Bei 7 Patienten lagen sowohl Primärtumor als auch Lymphknotenmetastasen vor. In 5 von 7

Diskussion

Fällen stimmte die Immunhistochemie überein (71%), wenn bei dem Primärtumor MMR vorhanden waren bzw. fehlten, so auch in den Lymphknotenmetastasen. In 2 von 7 Fällen zeigte sich eine Nichtübereinstimmung (28%). Da hier die Fallzahlen zu klein sind, kann keine valide Aussage bezüglich des Verhaltens der MMR bei Primärtumoren in Relation zu Lymphknotenmetastasen gemacht werden. Allerdings erscheint die Übereinstimmung bemerkenswert. Hier wäre die Fragestellung interessant, ob sich eine Chemoresistenz erst während einer Chemotherapie entwickelt. Mit dieser Frage beschäftigten sich die Gruppen um Lin, X et al. 2001 sowie Lin, X und Howell, S et al 2006. Die Hypothese war, dass frühzeitiges Einsetzen einer Therapie mit DDP die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Chemoresistenzen nicht nur in Bezug auf DDP erhöht. Die Vorstellung ist die, dass DDP resistente Mutanten begünstigt. Eine neuere Arbeit von Lin und Howell, 2006 beschäftigt sich mit der Schnelligkeit des Auftretens von Chemoresistenzen bei humanen CRC Zellen.

Die Immunhistochemie hat trotz der hohen Vorhersagefähigkeit mehrere Fehlermöglichkeiten. Fehler können bereits bei der Einbettung der Tumoren entstehen. Das Gewebe muss vollkommen von Formalin umgeben und getränkt sein. Die Tumoren müssen richtig klassifiziert werden. Bei der Immunhistochemie selbst müssen stets die gleichen Versuchsbedingungen eingehalten werden. Die Inkubationszeiten, Temperaturen, Antikörperversdünnungen müssen möglichst gleich sein. Die Haltbarkeit von Antikörpern, Puffern und Chromogenen müssen gewährleistet sein.

Neben der morphologischen Auswertung der Immunhistochemie wurde zur Kontrolle auch eine Software (QWin) zur Auswertung eingesetzt. Die Ergebnisse der Computerunterstützten Auswertung haben keine zusätzlichen Informationen ergeben. Allerdings sind hier die Fehlermöglichkeiten recht hoch. So wurden zum Teil recht niedrige Werte für Braunfärbungen bei Schnitten, die tatsächlich morphologisch stark angefärbt waren, von der Software bei der Computerauswertung ermittelt.

6 Zusammenfassung

Hodentumore sind die häufigsten soliden Tumoren junger Männer zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr. Eine Einteilung in seminomatöse und nichtseminomatöse Hodentumoren ist sinnvoll, da sich diese Tumoren in der Histologie sowie im biologischen und klinischen Verhalten unterscheiden. Auch bei einem metastasierten Hodentumor liegt die Heilungswahrscheinlichkeit bei ca. 90% mit den bekannten Chemotherapieschemata. Trotz dieser grossen Erfolgsrate erreichen 10-15% der Patienten keine komplette Remission mit den bekannten Chemotherapeutika und sterben an ihrer Erkrankung. Diese 10-15% der Fälle, wo man auf eine Chemoresistenz trifft, sind Gegenstand dieser Arbeit. Das Problem der Chemoresistenz ist nicht unbekannt. Das bekannteste Beispiel für Chemoresistenz ist das HNPCC. Untersuchungen haben hier aufgedeckt, dass diese Tumorgruppe über eine hohe Rate (ca. 90%) an MSI verfügt, welche durch einen Defekt der MMR-Gene hMLH1 sowie hMSH2 bedingt ist. Wegen der Chemoresistenz der HNPCC ist die Früherkennung hier von besonderer Relevanz, um den Primarius vor einer Metastasierung zu detektieren. Für die Selektion einer Screeningpopulation/Risikogruppe (etwa im Zusammenhang mit familiärem HNPCC) ist der Test des Verlustes der MMR deshalb von grosser Bedeutung, weil er mit HNPCC gut korreliert.

In Analogie zu den Gegebenheiten bei HNPCC wurde in dieser Arbeit untersucht, wie ein Defekt der MMR bei Hodentumoren mit Chemoresistenz korreliert. Dazu wurden insgesamt 27 Keimzelltumoren untersucht, wobei es sich um Primärtumoren, wie auch um Lymphknotenmetastasen handelte. Diese Tumoren wurden einer immunhistochemischen Analyse ausgesetzt, wobei auf das Vorhandensein bzw. Fehlen der beiden MMR-Gene hMLH1 und hMSH2 geprüft wurde.

Es zeigte sich, dass ca. 48% der chemoresistenten Hodentumoren einen Defekt entweder von hMLH1 oder hMSH2 aufwiesen, davon 37% nur einen Defekt des hMLH1 und 11% nur einen Defekt des hMSH2. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe (Mayer et al.) überein, welche allerdings nur 11 chemoresistente Keimzelltumoren untersuchte. Aufgrund der höheren Fallzahl in der vorgelegten Arbeit lässt sich eine mögliche Verbindung zwischen chemoresistenten Hodentumoren und einer defekten MMR tendenziell bestätigen. Diese Entdeckung kann Anlass für eine angepasste

Zusammenfassung

Screening- und Therapiestrategie sein. Tumoren mit einem MMR-Defekt sollten frühzeitig einer alternativen Therapie zugeführt werden. Schließlich weisen die Ergebnisse auf die Erfolgsmöglichkeit einer weiteren Stratifizierung von chemoresistenten Hodentumoren hin, etwa eine Stratifizierung nach Verlust von MMR und gleichzeitiger Mutation des p53 Gens.

In einer neueren Studie (Heidenreich, A, Peitgen, E, 2006) wurde das Thema der Bedeutung der MMR sowie des MDR-1 Proteins aufgegriffen. Neben der von mir bereits untersuchten Expression von hMLH1 und hMSH2 wurde in dieser Arbeit in Erweiterung der Fragestellung die immunhistochemische Expression von MDR-1 untersucht. Ziel war es, wie zuvor, prognostische Faktoren für die Ausbildung von Nekrose, bzw. nicht vitalem Tumor in residualen Tumoren nach systemischer Chemotherapie zu treffen. Aufgrund einer höheren Fallzahl von $n = 185$ Proben in dieser Studie ergibt sich ein aussagekräftigeres Ergebnis. Die Expression von hMLH1 sowie hMSH2 in den primären KZT zeigte hier ein ähnliches Expressionsmuster wie in meinen Untersuchungen, d.h. es wurde eine Korrelation zwischen den Expressionsmustern in den Primarien mit der Pathohistologie der residualen Tumoren gefunden, die allerdings nicht signifikant war.

Die Expression des MDR-1 Proteins hingegen konnte hier als signifikanter und unabhängiger prognostischer Risikofaktor für die Pathohistologie der Residualtumore bei Patienten mit KZT nach einer systemischen Chemotherapie mit anschliessender RPLA bestätigt werden. D.h. das Fehlen der MDR-1 Expression im Primarius korrelierte zu 80% mit Nekrose bzw. Fibrose in den residualen retroperitonealen Lymphknoten. Hingegen erwies sich die Expression des MDR-1 Proteins als ein schwächerer prognostischer Faktor für das Vorliegen von vitalem Tumor oder reifem Teratom in den residualen retroperitonealen Lymphknoten.

Daraus ergibt sich insgesamt, dass die Expression von MMR und MDR-1 eine Bedeutung für die Stratifikation von Patienten mit KZT im Hinblick auf eine notwendige, bzw. vermeidbare RPLA haben könnten.

7 Literaturverzeichnis

Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B et al.

Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. *Cancer Research* 56, 3087-3090, July 1, 1996

Aebi S, Fink D, Gordon R, et al. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1763-1767

Ahmed, T, Bosl, GJ, Hajdu, SI.

Teratoma with malignant transformation in germ cell tumors in men. *Cancer* 1985; 56:860.

Bercovici, J-P, Nahoul, K, Ducasse, M, et al.

Leydig cell tumor with gynecomastia: Further studies - the recovery after unilateral orchidectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:957.

Bosl, GJ, Ilson, DH, Rodriguez, E, et al.

Clinical relevance of the i(12p) marker chromosome in germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:349.

Bosl, GJ, Motzer, RJ.

Testicular germ-cell cancer [published erratum appears in *N Engl J Med* 1997 Nov 6;337(19):1403]. *N Engl J Med* 1997; 337:242.

Brosman, SA.

Testicular tumors in prepubertal children. *Urology* 1979; 13:581.

Brown, NJ.

Yolk-sac tumor ("orchioblastoma") and other testicular tumours of childhood. In: *Pathology of the Testis*, Pugh RC (Ed), Blackwell Scientific, Oxford 1976. p.356.

Bulun, SE, Rosenthal, IM, Brodie, AM, et al.

Use of tissue-specific promoters in the regulation of aromatase cytochrome P450 gene expression in human testicular and ovarian sex cord tumors, as well as in normal fetal and adult gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1616.

Burger H, Nooter K, Boersma AW, et al. Lack of correlation between cisplatin/induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-family proteins in testicular germ cell tumor cell lines. *Int J Cancer* 1997; 14:592-599

Burke, AP, Mostofi, FK.

Spermatocytic seminoma: a clinicopathologic study of 79 cases. *J Urol Pathol* 1993; 1:21.

Cummings, OW, Ulbright, TM, Eble, JN, Roth, LM.

Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1994; 25:54.

Dagash H, Mackinnon EA. Testicular microlithiasis: what does it mean clinically? *BJU Int.* 2006 Oct 9 (Epub ahead of print).

Derogee M, Bevers RF, et al. Testicular microlithiasis, a premalignant condition: prevalence, histopathologic findings, and a relation to testicular tumor. *Urology*. 2001 Jun; 57(6):1133-7.

Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Bouvier R et al. Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum reprod* 2001; 7: 1099-1105.

Dieckmann, KP, Pichlmeier, U.
The prevalence of familial testicular cancer: an analysis of two patient populations and a review of the literature. *Cancer* 1997; 80:1954.

Dieckmann, KP, Skakkebaek, NE.
Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer* 1999; 83:815.

Donadio, AC, Motzer, RJ, Bajorin, DF, et al.
Chemotherapy for teratoma with malignant transformation. *J Clin Oncol* 2003; 21:4285.

Dong, C, Lonnstedt, I, Hemminki, K.
Familial testicular cancer and second primary cancers in testicular cancer patients by histological type. *Eur J Cancer* 2001; 37:1878.

Eid H, Geczi L, Magori A, et al. Drug resistance and sensitivity of germ cell testicular tumors:evaluation of clinical relevance of MDR1, p53 and metallothionein proteins. *Anticancer Res* 1998; 18: 3059-3064

Fontanini G, Calcinai A, Boldrini L, et al.
Oncol Rep. 1999 Jul-Aug;6(4):813-7

Forman, D, Oliver, RT, Brett, AR, et al.
Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer* 1992; 65:255.

Ganem, JP, Workman, KR, Shaban, SF.
Testicular microlithiasis is associated with testicular pathology. *Urology* 1999; 53:209.

Goli Samini, Daniel Fink, Nissi M. Varki, Amreen Husain, William J. Hoskins, David S. Alberts, and Stephen B. Howell. Analysis of MLH1 and MSH2 Expression in Ovarian Cancer before and after Platinum Drug-based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 6: 1415-1421, 2000.

- Gourlay, WA, Johnson, HW, Pantzar, JT, et al.
Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. *Urology* 1994; 43:537.
- Han, H-J, Yanagisawa, A, Kato, Z, Park, J-G, and Nakamura, Y.
Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.* 1993;53:5087-5089
- Han, S, Peschel, RE.
Father-son testicular tumors: evidence for genetic anticipation? A case report and review of the literature. *Cancer* 2000; 88:2319.
- Hautmann, R. und Hulan, H.
Urologie, Springer Verlag, 1996
- Heidenreich A, Peitgen E, Seger M, et al. Prediction of residual retroperitoneal mass histology following postchemotherapy retroperitoneal surgery for metastatic nonseminomatous germ cell tumors: role of MDR-1 and mismatch repair genes. *Manuskript* 2006.
- Hori, K, Uematsu, K, Yasoshima, H, et al.
Testicular seminoma with human chorionic gonadotropin production. *Pathol Int* 1997; 47:592.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al.
Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10 ; 363(6429) :558-61
- Jemal, A, Murray, T, Samuels, A, et al.
Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003 53:5
- Jorgensen, N, Rajpert-De Meyts, E, Graem, N, et al.
Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995; 72:223.
- Junqueira, L.C. und Carneiro J.
Histologie, 4. Auflage. Springer Verlag 1996
- Krag Jacobsen, G, Barlebo, H, Olsen, J, et al.
Testicular germ cell tumours in Denmark 1976-1980. Pathology of 1058 consecutive cases. *Acta Radiol Oncol* 1984; 23:239.
- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, et al. MLH3 :
A DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet.* 2000 Jan ;24(1) :27-35

- Lothe RA, Peltomaki P, Tommerup N et al.
Molecular genetic changes in human male germ cell tumors. *Lab Invest* 1995; 73: 606-614.
- Manivel, JC, Reinberg, Y, Niehans, GA, Fraley, EE.
Intratubular germ cell neoplasia in testicular teratomas and epidermoid cysts. Correlation with prognosis and possible biologic significance. *Cancer* 1989; 64:715.
- Marcus V A, Madlensky L, Gryfe R, et al.
Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol*. 1999 Oct;23(10):1248-55.
- Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W et al.
Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 2002; 62: 2758-2760.
- Merlo, A , Mabry, M, Gabrielson , E, Vollmer, R, Baylin, SB, and Sidransky, D.
Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1994; 54:2098-2101
- Mostofi, FK, Price, EB Jr.
Tumors of the male genital system. In: *Atlas of Tumor Pathology*, 2nd ed, Firminger, HI (Ed), Armed Forces Institute of Pathology, Wahington, D.C. 1973. p.53.
- Mostofi, FK, Sesterhenn, IA, Davis, CJ Jr.
Developments in histopathology of testicular germ cell tumors. *Semin Urol* 1988; 6:171.
- Motzer, RJ, Amsterdam, A, Prieto, V, et al.
Teratoma with malignant transformation: diverse malignant histologies arising in men with germ cell tumors. *J Urol* 1998; 159:133.
- Muller, J, Ritzen, EM, Ivarsson, SA, et al.
Management of males with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis. *Horm Res* 1999; 52:11.
- Muller, J, Skakkebaek, NE.
Testicular carcinoma in situ in children with the androgen insensitivity (testicular feminisation) syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 288:1419.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B et al.
Mutations of two homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994 Sep 1 ;371(6492) :75-80
- Powles, T, Bower, M, Daugaard, G, et al.
Multicenter study of human immunodeficiency virus-related germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21:1922.

- Rajpert-De Meyts, E, Kvist, M, Skakkebaek, NE.
Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 1996; 428:133.
- Rapley, EA, Crockford, GP, et al.
Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours: *Nat Genet* 2000, 24(2), 197-200.
- Reddy, EK, Burke, M, Giri, S, et al.
Testicular neoplasms: seminoma. *J Natl Med Assoc* 1990; 82:651.
- Ribic, CM, Sargent, DJ, Moore, MJ, Thibodeau, SN, et al.
Tumor Microsatellite-Instability as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247-57
- Risinger, JI, Berchuck, A, Kohler, MF, Watson, P, Lynch, HT, and Boyd, J.
Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 1994; 53: 5100-5103
- Shridar, V, Siegfried, J, Hunt, J, del Mar Alonso, M, and Smith, DI.
Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1994; 54:2084-2087
- Skakkebaek, NE, Berethelsen, JG, Giwercman, A, Muller, J.
Carcinoma in situ: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987; 10:19.
- Strohsnitter, WC, Noller, KL, Hoover, RN, et al.
Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:545.
- Talerman, A, Haije, WG, Baggerman, L.
Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites: correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP. *Cancer* 1980; 46:380.
- Talerman, A.
Spermatocytic seminoma: clinicopathological study of 22 cases. *Cancer* 1980; 45:2169.
- The male genital tract.
In *Robbins Pathologic Basis of Disease*, Cotran, RS, Kumar, V, Collins, T, (Eds), WB Saunders, Philadelphia 1999, 6th edition. p. 1022.
- Thibodeau, SN, Bren, G and Shaid, D.
Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819
- Ulbright TM, Amin MB, Young RH: Tumors of the Testis, Adenexa,

Spermatic Cord, and Scrotum. In: Atlas of Tumor Pathology, 3rd ed, Rosai, J, Sobin, LH (Eds), Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 1999.

von der Maase H, Rorth, M, Walbom-Jorgensen, S, et al.
Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. Br Med J (Clin Res Ed) 1986; 293:1398.

Weir, HK, Marrett, LD, Kreiger, N, et al.
Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer. Int J Cancer 2000; 87:438.

Xinjian Lin and Stephen B. Howell. DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance. Mol Cancer Ther. 2006;5:1239-1247.

Xinjian Lin, Krishnan Ramamurthi, Misako Mishima, Akira Kondo, Randolph D. Christen, and Stephen B. Howell. p53 Modulates the Effect of Loss of DNA Mismatch Repair on the Sensitivity of Human Colon Cancer Cells to the Cytotoxic and Mutagenic Effects of Cisplatin. Cancer Research 61, 1508-1516, 2001.

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Hochschuldozenten:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bayer, Behr, Bertalanffy, Bien, Cetin, Daut, Feusser, Fruhstorf, Gemsa, Geuss, Görg, Gotthardt, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Herzum, Hesse, Hoeffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kaiser, Kann, Kern, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lennartz, Leppek, Lippert, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schulz, Schulze, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Sommer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Walters, Weihe, Werner und Zielke.

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Professor Dr.med A. Heidenreich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die vielen Anregungen bedanken. Durch die Arbeit habe ich mir moderne Methoden der Immunhistochemie erarbeiten können und Einblick in ein faszinierendes, aktuelles Gebiet der Tumorbilogie erhalten. Auch dafür möchte ich bedanken.

Professor Dr.med P. Barth möchte ich für die geduldige Ansicht der HE gefärbten Schnitte danken. Diese Sitzungen waren äußerst lehrreich, interessant und nicht zuletzt amüsant.

Mit Freude denke ich an die Zeit im urologischen Labor zurück. Die Hilfestellungen, Unterstützung und vielen netten Gespräche mit Frau Nottelmann und Heidrun Brandt sowie die wissenschaftlichen Anregungen und Hilfestellungen von PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad.

Viel Dank gilt auch dem Allgemein Chirurgischen Labor der Philipps-Universität Marburg, in dem die computerunterstützte Auswertung stattgefunden hat. Ich habe mich, obwohl aus einer anderen Abteilung stammend, dort stets willkommen gefühlt.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Tante Birgit Jaspert sowie meinem Onkel Uwe Jaspert bedanken, die mich mit ihrem klaren Verständnis so tatkräftig unterstützt haben. Meinen Eltern sowie meiner Schwester möchte ich danken, die mich immer wieder während des Studiums sowie der Promotion motiviert und unterstützt haben.

